Untersuchungen zur Konstitution des Lycopodiumsporonins

INAUGURAL-DISSERTATION

DER

HOHEN PHILOSOPHISCHEN FAKULTÄT II
DER UNIVERSITÄT BERN

ZUR

ERLANGUNG DER DOKTORWÜRDE

VORGELEGT VON

JOHANNA LIECHTI

von **Signau** (Bern)

ZÜRICH 1941
Diss.-Druckerei A.-G. Gebr. Leemann & Co.
Stockerstr. 64.

Untersuchungen zur Konstitution des Lycopodiumsporonins

INAUGURAL-DISSERTATION

DER

HOHEN PHILOSOPHISCHEN FAKULTÄT II

DER UNIVERSITÄT BERN

ZUR

ERLANGUNG DER DOKTORWÜRDE

VORGELEGT VON

JOHANNA LIECHTI

von **Signau** (Bern)

ZÜRICH 1941

Diss.-Druckerei A.-G. Gebr. Leemann & Co.

Stockerstr. 64.

Von der philosophischen Fakultät II auf Antrag des Herrn Professor Signer und nach Gutachten des Herrn Professor Zetzsche angenommen.

Bern, den 14. Mai 1936.

Der Dekan:
Prof. Dr. R. Zeller.

R. UNIV.
BIBLIOTHEEK
LEIDEN

Meinen sehr verehrten Lehrern der Chemie

Herrn Prof. Dr. V. Kohlschütter †
Herrn Prof. Dr. F. Ephraim †
Herrn Prof. Dr. F. Zetzsche
Herrn Prof. Dr. R. Signer

bleibe ich stets dankbar für ihre Förderung meines Studiums.

Herrn Prof. Dr. F. Zetzsche, unter dessen Leitung die vorliegende Arbeit im Institut für organische Chemie der Universität Bern entstand, danke ich herzlich für sein Interesse und seine Unterstützung.

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41547621_0039

Einleitung

Die Membransubstanz der Sporen und Pollen, das Sporopollenin, ist durch große Widerstandsfähigkeit gegen bio- und geochemische Einflüsse ausgezeichnet und findet sich deshalb in den meisten fossilen pflanzlichen Ablagerungen. Durch den Vergleich von rezenten und fossilen Sporopolleninen hofft man Einblick in die Vorgänge der Fossilierung zu erhalten. Dazu bedarf es der Erfassung möglichst zahlreicher rezenter und fossiler Sporopollenine. Wir untersuchten zu diesem Zweck weitere rezente Sporopollenine. Durch Untersuchungen an rezenten Sporopolleninen, die biochemischen Einflüssen ausgesetzt worden waren, versuchten wir einen Einblick in das Anfangsstadium der Inkohlung von Sporen und Pollen zu gewinnen.

Den besten Einblick in die Vorgänge der Fossilierung würde der Vergleich der Konstitutionsformeln rezenter und fossiler Sporopollenine gewährleisten. Bis jetzt ist über die Konstitution der Sporopollenine nur wenig bekannt. Deshalb beschäftigten wir uns mit Untersuchungen zur Konstitutionsermittlung des Lycopodiumsporonins. Wir führten den Ozonabbau durch und verglichen die Abbauprodukte mit denjenigen fossiler Sporonine.

I. Teil

Über rezente Sporopollenine

An rezenten Sporen und Pollen standen uns zur Verfügung Selaginella selaginoides und Dactylis glomerata. Der Dactylis-Pollen bildet ein hellgelbes, feines Pulver. Aus Selaginella gelang es uns nur die mengenmäßig stark vorherrschenden braunen Makrosporen zu isolieren, während die in geringer Menge vorhandenen Mikrosporen vernachlässigt wurden.

Der Pollen von Dactylus glomerata wurde nach den Angaben von *Zetzsche* (1) einer Vorbehandlung mit Tetrachlorkohlenstoff und absolutem Alkohol unterzogen und so von den anorganischen Verunreinigungen und Zellfragmenten getrennt.

Die Selaginella-Pflänzchen wurden fein zerrieben und verschiedenen Schlämmverfahren unterworfen, die jedoch keine vollständige Isolierung der Makrosporen erlaubten.

Die Inhaltsstoffe der Sporen und Pollen wie Zucker, Eiweiße, Fette und Harze wurden mit 5%iger Kalilauge entfernt. Dann wurde mit verdünnter Salzsäure alkalifrei gemacht und die Säure durch Auskochen mit Wasser entfernt. Zuletzt wurde mit Alkohol und Äther behandelt und getrocknet. Die Sporen und Pollen bestehen nach dieser Behandlung nur noch aus der eigentlichen Membran, die zusammengesetzt ist aus dem das Exosporium bildenden Sporopollenin und der das Endosporium bildenden Cellulose. Durch Behandlung mit 85%iger Phosphorsäure wurde die Cellulose entfernt. Die reinen Sporopollenine hatten die Farbe des Ausgangsmaterials und zeigten unter dem Mikroskop die Form der zugehörigen Sporen oder Pollen. Das Selaginella-Sporonin war noch verunreinigt, denn die aus Lignin bestehenden Anteile der Blattfragmente hatten sich in der Phosphorsäure nicht gelöst. Da durch Schlämmen und Aussieben nach dem Trocknen keine

Trennung erreicht wurde, blieb schließlich nichts anderes übrig, als unter der Lupe die Membranen auszulesen.

Der Gehalt der Sporen und Pollen ist, wie schon *Kalt* (2) festgestellt hat, bei den verschiedenen Pflanzengattungen stark schwankend. Im allgemeinen beobachtet man ein Absinken des Gehalts an Sporopollenin von den nieder organisierten zu den höher organisierten Pflanzen.

Wie *Zetzsche* und *Huggler* (3) zeigten, ist das aus Lycopodium gewonnene Sporonin gegen Säuren und Alkalien recht beständig, wird aber durch Oxydationsmittel leicht angegriffen. Die gleichen Eigenschaften zeigen alle bis jetzt untersuchten Sporopollenine. Ihr Verhalten bei der Aufarbeitung ist identisch und ihre Bruttoformeln sind einander sehr ähnlich, so daß die Sporen- und Pollenmembransubstanzen mit Recht zu einer Gruppe zusammengefaßt werden. Die Sporopollenine bestehen nur aus den Elementen Kohlenstoff, Wasserstoff und Sauerstoff. In einigen fossilen Sporopolleninen findet man außerdem noch Schwefel und Stickstoff. Diese Elemente sind aber erst nachträglich bei der Fossilierung in das Molekül eingetreten. Das Verhältnis von C : H in den Sporopolleninen ist, wie die Analysendaten zeigen, immer ungefähr dasselbe: 1 C auf 1,6 H. Das ist das C : H Verhältnis der Terpene. Das Verhalten der Sporopollenine weist auf ein polymeres Terpenderivat hin.

Zetzsche und *Vicari* (4) legten dem Lycopodiumsporonin die Formel $C_{90}H_{142}O_{27}$ zugrunde, die am besten auf die erhaltenen Analysenresultate paßte. Im folgenden wurde für alle Analysen C = 90 gesetzt, um so die relativen Ergebnisse miteinander in Vergleich zu bringen. Für das Pollenin des Dactylis glomerata berechneten wir nach den Daten der Elementaranalysen auf diese Weise die Bruttoformel $C_{90}H_{134}O_{23}$ und für das Sporonin der Selaginella selaginoides die Bruttoformel $C_{90}H_{140}O_{31}$.

Von *Zetzsche* und Mitarbeitern wurde schon eine ganze Reihe von Sporopolleninen isoliert und nach den Analysendaten durch ihre Bruttoformeln festgelegt.

Ordnet man alle bisher untersuchten Sporopollenine wie die zugehörigen Pflanzen nach dem natürlichen Pflanzensystem, so gelangt man zu folgender Reihe:

Lycopodium clavatum	$C_{90}H_{142}O_{27}$
Selaginella selaginoides	$C_{90}H_{140}O_{31}$
Ceratozamia mexicana	$C_{90}H_{148}O_{31}$
Taxus baccata	$C_{90}H_{138}O_{26}$
Pinus silvestris	$C_{90}H_{146}O_{27}$
Picea excelsa	$C_{90}H_{144}O_{26}$
Dactylis glomerata	$C_{90}H_{134}O_{23}$
Secale cereale	$C_{90}H_{134}O_{20}$
Phoenix dactylifera	$C_{90}H_{150}O_{23}$
Corylus avellana	$C_{90}H_{140}O_{25}$

Diese Formeln zeigen, daß die Sporopollenine nicht identisch sind, sondern eine Körperklasse bilden. Zur nähern Bezeichnung eines Sporopollenins ist daher der zugehörige Pflanzenname unerläßlich. Der Kohlenstoff-Wasserstoffgehalt aller angegebenen Formeln bewegt sich in den Grenzen des oben angegebenen Verhältnisses. Die Formeln scheinen mit dem natürlichen Pflanzensystem in keiner Beziehung zu stehen. Von Interesse ist die Rolle des Sauerstoffs im Sporopolleninmolekül. Bis jetzt konnte ein Anhaltspunkt für das Vorhandensein von Carbonyl- oder Carboxylsauerstoff nie gefunden werden. Die Acetylierung jedoch ist leicht durchführbar und läßt auf die Anwesenheit von Hydroxylgruppen schließen. Mit Hilfe der Acetylierung war es möglich, den Hydroxylsauerstoff quantitativ festzulegen.

Dazu wurden die Sporopollenine durch mehrstündiges Kochen mit Essigsäureanhydrid acetyliert. Die Acetylprodukte sind meist in Form und Farbe gleich den entsprechenden Sporopolleninen. Ausnahmen machen bis jetzt nur die Acetylsporopollenine von Pinus silvestris und Corylus avellana, deren Farbe nach braun vertieft ist. Die Acetylsporopollenine wurden mit 5 n KOH verseift und nach Zugabe von Phenolphtalein wurde mit HCl zurücktitriert.

Auf Grund der erhaltenen Resultate können die Bruttoformeln der bis jetzt untersuchten Sporopollenine in folgende Formeln aufgelöst werden:

Lycopodium clavatum	$C_{90}H_{127}O_{12}(OH)_{15}$
Ceratozamia mexicana	$C_{90}H_{135}O_{18}(OH)_{13}$
Taxus baccata	$C_{90}H_{128}O_{16}(OH)_{10}$
Pinus silvestris	$C_{90}H_{135}O_{14}(OH)_{13}$
Picea excelsa	$C_{90}H_{133}O_{15}(OH)_{11}$
Dactylis glomerata	$C_{90}H_{122}O_{11}(OH)_{12}$
Secale cereale	$C_{90}H_{127}O_{13}(OH)_{7}$
Phoenix dactylifera	$C_{90}H_{144}O_{14}(OH)_{9}$
Corylus avellana	$C_{90}H_{131}O_{16}(OH)_{9}$

In der obigen Aufstellung sind die Pflanzen nach dem natürlichen Pflanzensystem geordnet. Bemerkenswert ist das Absinken des Hydroxylgehaltes der Sporopollenine von den Kryptogamen über die Gymnospermen zu den Angiospermen. Der nicht als Hydroxylsauerstoff festgelegte Sauerstoff muß, da weder Carbonyl- noch Carboxylgruppen nachweisbar sind, als ätherartig gebundener Sauerstoff aufgefaßt werden. Der Wasserstoffgehalt und der Gehalt an Äthersauerstoff der Sporopollenine schwankt innerhalb kleiner Grenzen und kann in keine Beziehung zum natürlichen Pflanzensystem gebracht werden.

Über biochemisch beeinflußte Sporopollenine

In den meisten fossilen pflanzlichen Ablagerungen werden mehr oder weniger gut erhaltene Sporopollenine aufgefunden. In den quartären Ablagerungen bilden sie die Grundlage der Pollenanalyse, die in letzter Zeit stark ausgebaut wurde und mit deren Hilfe wir Einblick in Klima und Vegetation vergangener Erdepochen erhalten. Das regelmäßige Vorkommen größerer oder kleinerer Mengen von Sporopolleninen in pflanzlichen Ablagerungen wie Kohlen und Ölschiefer hat einige Forscher, wie R. Thiessen, Th. Lange, J. Zerndt u. a., bewogen, die Sporopollenine als Leitfossilien zur Lösung stratigraphischer Kohlenprobleme heranzuziehen. Dazu sind sie sehr geeignet, da sie außer ihrem fast regelmäßigen Vorkommen meist auch in gutem Erhaltungszustande vorkommen und so verhältnismäßig leicht identifi-

ziert werden können. Es treten aber neben den gut erhaltenen Sporopolleninen auch solche auf, die schon morphologisch sehr deutliche Veränderungen aufweisen. Man muß sich deshalb fragen, wie weit die Sporopollenine überhaupt als resistent aufzufassen sind. Bei der Untersuchung rezenter Sporopollenine erscheinen die Membranen außer gegen Oxydationsmittel sehr beständig. Die chemische Untersuchung fossiler Sporopollenine durch *Zetzsche* und *Kälin* (5) und *Ziegler* (6) hat gezeigt, daß dieselben im Laufe der Inkohlung ganz typische chemische Veränderungen erleiden. Auffallend ist in erster Linie der Eintritt von Schwefel und Stickstoff in das Molekül der in rezentem Zustande nur aus Kohlenstoff, Wasserstoff und Sauerstoff bestehenden Sporopollenine, wie es für Geiseltaler Pollenine und Bothrodendrin nachgewiesen wurde. Der morphologische Habitus braucht aber durch diesen Eintritt von S und N nicht grundlegend verändert zu werden. Ein Vergleich der bis jetzt untersuchten fossilen Sporopollenine mit entsprechenden rezenten Sporopolleninen läßt aus dem Verhältnis C : H deutlich erkennen, daß die Sporopollenine selbst eine Inkohlung durchgemacht haben, wie das ja von ihnen als einem Kohlenbaustoff zu erwarten ist. Wir geben im folgenden eine Zusammenstellung aller bisher bekannter fossiler und rezenter Sporopollenine:

I. Sporonine:

Fossil	*Rezent*
Tasmanin $C_{90}H_{134}O_{15}(OH)_2$	Lycopodium clav. $C_{90}H_{127}O_{12}(OH)$
Bothrodendrin $C_{90}H_{111}O_{12}(OH)_9S$	Selaginella $C_{90}H_{140}O_{31}$
Lange-Sporonin $C_{90}H_{89}O_{19}N$ und $C_{90}H_{78}O_{13}(OH)_4N$	

II. Pollenine:

Wetterau 1	$C_{90}H_{110}O_{36}$ (wovon 1 OH)	Ceratozamia	$C_{90}H_{135}O_{18}(OH)_{13}$
Wetterau 2	$C_{90}H_{117}O_{27}$	Taxus baccata	$C_{90}H_{128}O_{16}(OH)_{10}$
Wetterau 3	$C_{90}H_{96}O_{34}$	Pinus silvestris	$C_{90}H_{135}O_{14}(OH)_{13}$
Wetterau 4	$C_{90}H_{98}O_{28}$	Picea excelsa	$C_{90}H_{133}O_{15}(OH)_{11}$
Wetterau 5	$C_{90}H_{110}O_{28}$	Dactylis glom.	$C_{90}H_{122}O_{11}(OH)_{12}$
Saarau	$C_{90}H_{119}O_{25}(OH)$	Secale cereale	$C_{90}H_{127}O_{13}(OH)_7$
Geiseltal 1	$C_{90}H_{121}O_{11}(OH)_8NS_7$	Phoenix dact.	$C_{90}H_{144}O_{14}(OH)_9$
Geiseltal 2	$C_{90}H_{142}O_{18}S_7N$	Corylus avell.	$C_{90}H_{131}O_{16}(OH)_9$

Errechnet man aus diesen fossilen und rezenten Sporopolleninen Durchschnittsformeln, was besonders berechtigt ist bei den Polleninen, da die fossilen Pollenine alle ein Gemisch von Gymnospermen- und Angiospermenpollenhüllen bilden, so ergibt sich folgende Bilanz:

I. Kryptogamen:

Rezent	$C_{90}H_{141}O_{29}$	C : H = 1 : 1,6
Fossil	$C_{90}H_{128}O_{15}$	C : H = 1 : 1,4

II. Phanerogamen:

Rezent	$C_{90}H_{132}O_{14\ 15}(OH)_{10-11}$	C : H = 1 : 1,6
Fossil	$C_{90}H_{111-112}O_{24}(OH)_{2-8}$	C : H = 1 : 1,2

Auffällig ist vor allem der sehr viel niedrigere Hydroxylgehalt und der geringere H-Gehalt der fossilen Sporopollenine. Unverändert durch bio- und geochemische Einflüsse ist offenbar der noch nicht näher charakterisierte vermutliche Äthersauerstoff.

Durch Behandlung mit Brom und rauchender Salpetersäure werden die Sporopollenine bromiert und nitriert. Ein Vergleich der Umrechnungsfaktoren von Sporopollenin zu Bromnitrosporopollenin zeigt ebenfalls deutliche Unterschiede zwischen rezenten und fossilen Sporopolleninen. Der Faktor für die rezenten Sporopollenine liegt nahe und über dem Wert von 0,5, während er für fossile Sporopollenine beträchtlich höhere Werte annehmen kann:

Rezente Sporopollenine	*Faktor*	*Fossile Sporopollenine*	*Faktor*
Lycopodium clavatum	0,575	Tasmanin	0,5901
Taxus baccata	0,5206	Bothrodendrin	0,6506
Pinus silvestris	0,5510	Saarau Pollenin	0,966
Phoenix dactylifera	0,5684	Wetterau Pollenin	0,89 bis 2,98
Corylus avellana	0,5454		je nach Tiefe u. Feinkörnigkeit

Autoxydiertes rezentes Picea-Pollenin erreichte ebenfalls den hohen Faktorwert von 1,013. Die auffallend hohen Faktoren der Saarau und besonders Wetterau Pollenine beweisen nach *Ziegler* (6), daß es sich um für ihren Inkohlungsgrad sehr sauerstoffreiche Verbindungen handelt. Farbreaktionen mit konzentrierter Schwefelsäure, wie sie rezente Sporopollenine zeigen, treten bei fossilen Sporopolleninen nicht auf. Schon aus Torf isolierte Sporenmembranen geben sehr selten eine dieser Farbreaktionen. Der diese

Reaktionen gebende gelbe Farbstoff wird eben bei der Inkohlung der Sporopollenine sehr schnell verändert. Bei der Inkohlung verschwinden auch die Zellinhaltsstoffe der Sporen und Pollen, wie Eiweiße, Zucker, Fette, sehr schnell.

Beim Abbau durch Ozon zeigten sich ebenfalls Unterschiede zwischen rezentem und fossilem Sporonin, worauf wir später noch eingehen werden.

Um fossile Sporonine in überschüssiger rauchender Salpetersäure zu lösen, braucht es eine wesentlich längere Einwirkungsdauer als bei rezentem Material. So wurde Sporonin von

Lycopodium völlig gelöst in	12 Stunden
Bothrodendrin	24—30 Stunden
Tasmanin	3 Wochen

Daraus zog Zetzsche den Schluß, daß der oxydative Angriffspunkt vornehmlich in den freien Hydroxylgruppen liege.

Die morphologischen Unterschiede zwischen rezenten und fossilen Sporopolleninen erweisen sich ganz den chemischen Unterschieden entsprechend. Der morphologische Erhaltungszustand der fossilen Sporen- und Pollenmembranen ist besonders wichtig für sporen- und pollenanalytische Untersuchungen sowohl des Torfs wie der Kohlen und Ölschiefer. *F. Kirchheimer* (7), Gießen, hat eingehende Untersuchungen über die Erhaltungszustände der Sporopollenine angestellt. Er stellte fest, daß die fossilen Sporopollenine Schädigungen von sehr ungleichem Maß aufweisen. Prinzipiell ist zwischen Primärschädigungen durch Inkohlung und Sekundärschädigungen durch Aufbereitung zu unterscheiden. Die Aufarbeitung der fossilen Sporopollenine nach dem Brom-Nitro-Verfahren von *Zetzsche* und *Kälin* (8) erlaubt in den meisten Fällen eine Isolierung der Sporopollenine ohne Aufbereitungsschädigungen, wie sich aus zahlreichen Untersuchungen ergab. Auch zeigen die nach dem Brom-Nitro-Verfahren isolierten Sporopollenine eine nur unerhebliche Größenveränderung, während von Kirchheimer bei Verwendung von KOH oder HNO_3 zur Aufbereitung ganz erhebliche Größenveränderungen nachgewiesen wurden. Nach der Methode von Zetzsche erhält man also die Membranen in der Größe, wie sie in den Gesteinen vorliegen, was für paläobotanische Zwecke wertvoll ist.

Die Primärschädigungen der fossilen Sporopollenine können in zwei Gruppen eingeteilt werden. Die ersten sind verursacht durch die chemischen Veränderungen der Sporopollenine im Laufe der Inkohlung. Diese morphologischen Veränderungen werden von Kirchheimer als Korrosion und Desorganisation bezeichnet. Die Korrosion äußert sich in der Deformation und dem fortschreitenden Zerfall der Exinen. Desorganisierte Exinen zeigen feine Granularstruktur.

Die zweite Gruppe der morphologischen Schädigungen ist verursacht durch eine thermische Beanspruchung der Sporopollenine während der Inkohlung. *Zetzsche* und *Kälin* (9) untersuchten Lycopodium-Sporonin, Tasmanin und Bothrodendrin auf ihr thermisches Verhalten, indem sie die Sporonine einer steigenden Erhitzung aussetzten. Gegen 200 ^{0} machte sich eine Wasserabspaltung bemerkbar und über 300 ^{0} zersetzten sich die Sporonine unter Auftreten eines braunen Destillates und charakteristischen Geruches zu einem dunklen Pech. *Kirchheimer* (10) wies an thermisch beanspruchtem Lycopodium-Sporonin und an Pollen aus der Stangenkohle des Meißner bei Kassel, die durch eine basaltische Intrusion bis zu 5 m vom Kontakt durch die Hitzeeinwirkung verändert wurden, nach, daß sich die Erhitzung in einer Abnahme der mittleren Sporengröße äußert. Außerdem machen sich thermische Schädigungen stark geltend in der Struktur der Sporopollenine von undulösen Veränderungen der Netzmaschen über stark verändertes Maschenwerk bis zu einem völligen Verlust der Maschenskulptur. Hand in Hand damit geht die Deformation, die Farbvertiefung nach dunklen Tönen, die Erhöhung des Brechungskoeffizienten, der Verlust der idiomorphen Begrenzung. Schließlich bleiben nur noch amorphe Bitumenkugeln übrig.

Die thermische Schädigung der Sporen- und Pollenmembranen scheint in den Kohlen ziemlich verbreitet zu sein. Kirchheimer stellte fest, daß sie sich unabhängig von der Korrosion und Desorganisation äußert. Aus den morphologischen Veränderungen der thermisch beanspruchten Lycopodium-Sporonine konnten *Zetzsche* und *Kälin* wichtige Rückschlüsse auf die Inkohlungstemperatur der Braun- und Steinkohlen ziehen.

Morphologische und chemische Untersuchungen führen also übereinstimmend den Beweis für die Veränderungsmöglichkeiten der Sporen und Pollen während der Inkohlung.

Es war nun interessant festzustellen, ob schon in kurzer Zeit unter biochemischen Einflüssen chemische und morphologische Veränderungen nachweisbar sind.

Sporen von Lycopodium clavatum, die während 17 Monaten als Bodengrund in einem mit Algen reichlich besiedelten Aquarium gedient hatten, wurden nach der Methode von *Zetzsche* aufgearbeitet. Das reine Sporonin zeigte in trockenem Zustand eine leichte Verfärbung nach dunkleren Nuancen des ursprünglichen Bleichgelbs. Aus den Analysendaten berechneten wir die Bruttoformel zu $C_{90}H_{138}O_{28}$. Die Formel des rezenten Lycopodiumsporonins wurde von *Zetzsche* und *Vicari* (4) zu $C_{90}H_{112}O_{27}$ bestimmt. Durch Acetylierung und nachherige Verseifung bestimmten wir die Anzahl der im Molekül vorhandenen OH-Gruppen zu 13. Die Bruttoformel kann demnach aufgelöst werden in

$$C_{90}H_{125}O_{15}(OH)_{13},$$

während *Zetzsche* und *Vicari* für rezentes Sporonin

$$C_{90}H_{127}O_{12}(OH)_{15}$$

fanden. Der Vergleich dieser zwei Formeln ergibt also für das gefaulte Sporonin eine Abnahme des Wasserstoffs um 4 H und eine Abnahme der Hydroxylgruppen um 2 OH. Der vermutliche Äthersauerstoff wird um 3 O vermehrt. Dieses Ergebnis steht in Einklang mit den fossilen Sporoninen, obschon hier natürlich in der kurzen Zeit die Abnahme des H und der OH geringer ist. Man kann sich die Formel des biochemisch beeinflußten Lycopodiumsporonins aus derjenigen des rezenten durch eine Abgabe von 2 H_2O, also eine merkliche Dehydratation, und eine Zunahme von 3 O entstanden denken. Auch beim gefaulten Sporonin läßt sich der Sauerstoff neben dem Hydroxylsauerstoff mit den üblichen Mitteln nicht als Carbonylsauerstoff nachweisen.

Von Herrn *Kirchheimer,* Gießen, wurde uns Pollen von Corylus avellana, der 2 Monate gefault hatte, zur Verfügung gestellt. Der Pollen war mit Leitungswasser zu einem dicken Brei angerührt worden. Die Temperatur des Versuchsraumes betrug

18—20°. Nach 14 Tagen zerfloß der steife Pollenbrei zu einer schleimig-schmierigen Masse und gleichzeitig trat Faulgeruch auf. Nach 2 Monaten schien der Fäulnisprozeß beendigt, auf der Pollenmasse siedelten sich Schimmelpilze an. Der Pollen wurde von den Mycelien gereinigt und über Phosphorpentoxyd getrocknet.

1,0 g dieses gefaulten Pollens arbeiteten wir nach der üblichen Methode auf und erhielten 0,3026 g Membranstoff. Nach der Hydrolyse mit Phosphorsäure zur Entfernung der Cellulose blieben uns 0,2775 g reines Pollenin. Der Anteil an hydrolysierbaren Membransubstanzen beträgt demnach 0,0251 g, d. h. 8,1%. Der normale Cellulosegehalt des rezenten Coryluspollenins wurde von *Kalt* (2) zu 1,1 % bestimmt. Die Ausbeute an Pollenin aus rezentem Pollen betrug 7,3 %, während wir aus dem gefaulten Pollen 27 % Pollenin erhielten. Dieser hohe Polleningehalt muß auf einer relativen Anreicherung von Membransubstanz infolge der Zerstörung des Zellinhalts und des Schwindens der Intine beruhen. Überraschend hoch ist der Anteil der hydrolysierbaren Membranbestandteile, die bei Corylus normalerweise 15 % des Pollenins betragen, durch den Fäulnisprozeß aber auf 30 % angestiegen sind. Da Zellinhalt und Intine durch die Fäulnis schon zerstört sind, muß demnach ein Teil der für gewöhnlich nicht hydrolysierbaren Membransubstanz in hydrolysierbare Verbindungen umgewandelt worden sein.

Aus den Analysendaten des Pollenins ergab sich die Bruttoformel $C_{90}H_{138}O_{23}$ oder $C_{90}H_{140}O_{23}$. Die Formel des rezenten Pollenins ist $C_{90}H_{140}O_{25}$. Die rohe Bilanz ergibt also eine Abnahme um 2 O beim gefaulten Pollenin, eventuell auch eine Abnahme um 2 H. Der Wasserstoffwert läßt sich nicht eindeutig angeben, da die Prozentzahlen für 138 und 140 H sehr nahe beieinander liegen und nicht genügend Material für eine größere Anzahl von Elementaranalysen vorlag. Die Anzahl der Hydroxylgruppen bestimmten wir im gefaulten Pollenin zu 15. Die Bruttoformel kann also aufgelöst werden in $C_{90}H_{123}O_8(OH)_{15}$ resp. $C_{90}H_{125}O_8(OH)_{15}$. Die Formel des rezenten Pollenins lautet $C_{90}H_{131}O_{16}(OH)_9$. Die OH-Gruppen sind demnach um 6 vermehrt worden, der Wasserstoff hat um 8 resp. 6 abgenommen, der vermutliche Äthersauerstoff hat um 8 abgenommen. Man darf

also schon von einer Inkohlung sprechen, da H und O im Verhältnis zu C gemindert sind. Auffällig ist die Zunahme des Hydroxylsauerstoffs und die Abnahme des übrigen Sauerstoffs, während beim gefaulten Lycopodium-Sporonin gerade umgekehrte Verhältnisse vorliegen.

Kirchheimer (7) hat die Sporopollenine der gefaulten Sporen und Pollen in morphologischer Hinsicht untersucht. Die morphologischen Veränderungen des Lycopodiumsporonins bestanden einzig darin, daß das die Lumina der Exospormaschen überspannende Häutchen zerstört war. Beim gefaulten Coryluspollen waren sie viel erheblicher. Der Polleninhalt und die Intine schwinden völlig, die Exine spaltet auf. Die Pollenkörner werden zum Teil stark verformt. Von den 5 Lamellen der Exine werden die beiden dickern zerstört. Sämtliche Exinen sind nach dem zweimonatigen Fäulnisprozeß mehr oder weniger geschädigt. Die Erhaltungszustände hat Kirchheimer als sehr mannigfaltig beschrieben. Er hat zwei sowohl strukturell als auch in der Größe deutlich verschiedene Erhaltungszustände abgeleitet.

Die Ursache der Sporen- und Pollenkorrosion kann auf physikalisch-chemische und auf biologische Faktoren zurückgeführt werden. Sporen scheinen nach den bisherigen Untersuchungen morphologisch viel geringeren Änderungen als die Pollen zu unterliegen. Man könnte diese Tatsache auf eine größere chemische Resistenz oder Trägheit zurückführen, da sie ja auch chemisch geringere Veränderungen als die Pollen erleiden. Doch spielen wahrscheinlich auch statische Faktoren eine Rolle. Die Sporenmembranen sind wesentlich dicker als diejenigen der Pollen. Die Pollenexinen lassen zudem leicht Wasser durchtreten, die Intinen quellen auf und unterwerfen die Exinen einer starken Spannung, die zu einer Sprengung der Pollen führen kann, wie dies für einige Pollengattungen schon lange bekannt ist. Die Pollen sind autoxydabel, die Sporen nicht. Die Exinen der Pollen sind elastisch. Durch Schwefeln während der Inkohlung werden sie starr und spröde und zerbrechen schon bei geringen Druckbeanspruchungen.

Die Hauptursachen der Sporen- und Pollenschädigung sind in den chemischen Veränderungen und der thermischen Beanspruchung während der Inkohlung zu suchen. *Kirchheimer* führt die

Schädigung des gefaulten Coryluspollens auf die Wirkung pflanzlicher Mikroben zurück. Ein Kontrollversuch unter sterilen Verhältnissen gab keine entsprechenden Erscheinungen. Die biologische Korrosion ist identisch mit der Veränderung der Pollenexine durch starke Oxydationsmittel, besonders Chromsäure.

Sporen und Pollen erleiden also schon zu Beginn der Inkohlung in relativ kurzer Zeit chemische und morphologische Veränderungen unter Einfluß physikalischer und biologischer Faktoren. Im Laufe der Inkohlung treten weitere morphologische Veränderungen entsprechend den chemischen Veränderungen auf. Für die sporen- und pollenanalytischen Untersuchungen spielt diese Tatsache eine große Rolle. Die Kenntnis der Erhaltungsfähigkeit der Sporen und Pollen und die Unterscheidung der Erhaltungszustände der Sporopollenine allein erlaubt eine objektive Pollenanalyse.

Experimenteller Teil

1. Reinigen der Sporen und Pollen

Das rohe Sporen- und Pollenmaterial ist stets durch Fremdstoffe, wie Fragmente von Pflanzenteilen, Staub, Sand usw., verunreinigt. Der Pollen von Dactylis glomerata wurde nach den Angaben von *Zetzsche* (1) vorerst durch feine Müllergaze ausgesiebt und so von den gröbsten Verunreinigungen getrennt. Hierauf wurde der Pollen in einer Kristallisierschale in viel Tetrachlorkohlenstoff eingetragen, umgerührt und verdeckt stehen gelassen, bis sich die spezifisch leichtern Pollen an der Oberfläche gesammelt und die anorganischen Verunreinigungen am Boden abgesetzt hatten. Die Pollen wurden abgeschöpft und das Aufschlämmen mehrmals wiederholt. Die Zellfragmente lassen sich durch ihr spezifisches Gewicht ebenfalls von den Pollen trennen. Dazu wurde der Pollen wieder in Tetrachlorkohlenstoff eingetragen und durch Rühren verteilt. Dann wurde unter Rühren vorsichtig absoluter Alkohol zugegeben, bis beim Stehen das spezifische Gewicht soweit erniedrigt war, daß sich die Zellfragmente langsam zu Boden setzten, während die Pollen sich an der Oberfläche sammelten. Sie wurden abgeschöpft und diese Behandlung mehrmals wiederholt. Das gereinigte Material wurde unter dem Mikroskop nachgeprüft. Der Aschengehalt lag unter 1 %.

Zur Gewinnung der Sporen von Selaginella selaginoides zerrieben wir die getrockneten Pflänzchen von Hand und dann noch in der Kugelmühle. Dann versuchten wir die Sporen von den Pflanzenteilchen durch Schlämmen zu trennen. Das gelang uns nicht, da die Pflanzenteilchen mengenmäßig stark vorherrschten. Durch Schlämmen in einem Schlämmapparat, wie man ihn für geologische Zwecke braucht, konnten wir das Material im wesentlichen in drei Fraktionen trennen:

a) Pflanzenteile und Mikrosporen,
b) Pflanzenteile und wenig Mikro- und Makrosporen,
c) Pflanzenteile und Makrosporen.

Fraktion c war weitaus die größte. Durch Abspritzen auf Drahtsieben verschiedener Maschenweite versuchten wir sie weiter zu reinigen, was aber nicht gelang. Auch durch Sieben nach dem Trocknen war keine Reinigung erreichbar. Wir arbeiteten deshalb die Makrosporen ohne Isolierung von den Pflanzenteilen auf.

Die Sporen von Lycopodium clavatum aus dem Aquarium trennten wir von Algen durch Abspritzen auf Drahtsieben passender Maschenweite. Nach dem Trocknen reinigten wir sie wie beim Dactylispollen angegeben.

2. Gewinnung der resistenten Sporen- und Pollenmembranen

Die gereinigten Sporen oder Pollen wurden zur Entfernung der Inhaltsstoffe wie Zucker, Eiweiß, Fette und Wachse am besten mit 6—10 Teilen 5%iger Kalilauge 6 Stunden am Rückflußkühler gekocht, wobei stets kräftig Luft durchgesaugt wurde, um das Ansammeln der Sporen oder Pollen am Boden des Kolbens zu verhüten, wo sie eine thermische Zersetzung erleiden können. Dann wurde heiß abgenutscht, bei kleinen Mengen durch Glasfiltertiegel von Schott u. Gen. G3 oder G4, bei großen Mengen durch eine Nutsche mit einer doppelten Lage von gut ausgekochtem Filterleinen. Der auf dem Filter verbliebene Rückstand wurde wieder in den Kolben gebracht und nochmals der gleichen Alkalibehandlung unterworfen. Dabei vertieften die Sporen oder Pollen ihre Farbe. Die Filtrate waren dunkelbraun gefärbt.

Nach der Einwirkung der Lauge wurde der Filterrückstand einige Male mit Wasser ausgekocht und filtriert. Dann wurde mit etwa 1%iger Salzsäure einige Stunden gekocht, filtriert, wieder einige Male mit Wasser ausgekocht, bis das Filtrat salzsäurefrei war. Nun wurde noch 2—3mal mit Alkohol ausgekocht und schließlich nach kräftigem Absaugen in Äther eingetragen und

über Nacht stehen gelassen. Nach dem Absaugen des Äthers wurden die reinen Membranen bei 90—100° im Trockenschrank getrocknet.

3. Isolierung der Sporopolleninmembran

Die nach diesen Behandlungen erhaltenen Sporen oder Pollen bestanden nur noch aus der Sporopolleninmembran, die das Exosporium, und einer Cellulosemembran, die das Endosporium ausmacht. Sie besaßen wieder die Farbe des Ausgangsmaterials. Die Cellulose wurde mit 85%iger Phosphorsäure hydrolysiert. Die Membransubstanz wurde in der 35fachen Menge Phosphorsäure (D 1,7) in eine Pulverflasche mit Glasstopfen eingetragen und durch kräftiges Schütteln verteilt. Die Membranen quollen in der Säure stark auf und wurden unter mehr oder weniger starker Farbvertiefung nach braunschwarz klebrig. Oft mußte noch mehr Phosphorsäure zugefügt werden, damit ein dickflüssiger Brei entstand. Unter häufigem Umschütteln wurde ca. 10 Tage stehen gelassen. Dann wurde mit dem gleichen Volumen Wasser verdünnt und im Glasfiltertiegel oder bei größeren Mengen über Filterleinen abgesaugt. In so verdünnter Phosphorsäure trat noch keine Trübung auf. Es wurde mit gleich verdünnter Säure gewaschen, mit Wasser gekocht und ausgewaschen, bis die Prüfung auf PO_4-Ionen negativ verlief.

Nach Behandlung mit Phosphorsäure überzeugten wir uns durch Entnahme einer kleinen Probe von der vollständigen Entfernung der Cellulose. Die Probe wurde nach dem Auswaschen mit Wasser mit 60prozentiger Salpetersäure gelinde erwärmt, wobei klare Lösung erfolgte. Jetzt wurde mit Alkohol ausgekocht, hierauf in Äther stehen gelassen, dann abfiltriert und im Trockenschrank zwischen 90—100° getrocknet und in den Vakuumexsiccator über Phosphorpentoxyd gebracht.

Die so erhaltenen Sporopollenine hatten die Farbe des Ausgangsmaterials und zeigten unter dem Mikroskop die Form der zugehörigen Sporen oder Pollen.

4. Veraschung der Sporopollenine

Die Sporopollenine wurden ganz langsam bei kleiner Flamme verschwelt. Ein Verlust durch Versprühen trat auf diese Weise nicht ein. Der Aschengehalt der untersuchten Sporopollenine bewegte sich zwischen 0,75—1,15 %. Die Asche bestand in der Hauptsache aus Kieselsäure, zu einem kleinern Teil aus Tonerde.

5. Entfernung der Kieselsäure

Um den Aschengehalt möglichst zu reduzieren, wurden die Sporopollenine einer Behandlung mit 40%iger Flußsäure unterzogen. Die Membranen wurden in einem verschließbaren Bleitiegel mit HF zu einem dünnen Brei angerührt und mehrere Tage verschlossen stehen gelassen. Dann wurde rasch über Filterleinen in einer paraffinierten Nutsche abgesaugt, zuerst mit Flußsäure, dann mit konzentrierter Salzsäure und schließlich wiederholt mit heißem Wasser gewaschen. Darauf wurde noch längere Zeit in oft erneuertem destilliertem Wasser stehen gelassen, bis das Wasser nicht mehr sauer reagierte. Nach dem Behandeln mit Alkohol und Äther wurde wie üblich getrocknet. Der Aschengehalt betrug jetzt 0,1 –0,3 %. Da aber die Werte etwas wechselten, wurde bei den Elementaranalysen das Schiffchen jedesmal zurückgewogen und der jeweils gefundene Aschengehalt in Anrechnung gebracht.

6. Elementaranalysen der Sporopollenine

Die Analysendaten ergaben folgende Bruttoformeln:

a) Selaginella selaginoides $C_{90}H_{140}O_{31}$.

5,052 mg Substanz
5,021 mg aschefrei gaben 11,590 mg CO_2 und 3,715 mg H_2O
4,882 mg Substanz
4,851 mg aschefrei gaben 11,190 mg CO_2 und 3,540 mg H_2O

Berechnet	C = 62,90 %	H = 8,22 %
Gefunden	C = 62,95 %	H = 8,28 %
	C = 62,90 %	H = 8,16 %

b) Dactylis glomerata $C_{90}H_{134}O_{23}$.

0,0391 g Substanz
0,0390 g aschefrei gaben 0,0974 g CO_2 und 0,027 g H_2O

0,0464 g Substanz
0,0460 g aschefrei gaben 0,1148 g CO_2 und 0,0362 g H_2O

Berechnet	C = 68,22 %	H = 8,53 %
Gefunden	C = 68,11 %	H = 8,52 %
	C = 68,05 %	H = 8,80 %

c) Lycopodium clavatum aus dem Aquarium $C_{90}H_{138}O_{28}$.

0,1540 g Substanz
0,1529 g aschefrei gaben 0,3630 g CO_2 und 0,117 g H_2O

0,1578 g Substanz
0,1566 g aschefrei gaben 0,3733 g CO_2 und 0,1168 g H_2O

0,1560 g Substanz
0,1548 g aschefrei gaben 0,3691 g CO_2 und 0,1151 g H_2O

Berechnet	C = 64,78 %	H = 8,34 %
Gefunden	C = 64,76 %	H = 8,54 %
	C = 65,00 %	H = 8,33 %
	C = 65,03 %	H = 8,32 %

d) Corylus avellana, 2 Monate gefault.

5,065 mg Substanz
4,987 mg aschefrei gaben 12,460 mg CO_2 und 3,990 mg H_2O

Berechnet auf $C_{90}H_{138}O_{23}$	C = 68,03 %	H = 8,76 %
Berechnet auf $C_{90}H_{140}O_{23}$	C = 67,95 %	H = 8,87 %
Gefunden	C = 68,14 %	H = 8,95 %

7. Bestimmung der freien Hydroxylgruppen durch Acetylierung

1 g eines Sporopollenins wurde mit 50 ccm reinem Essigsäureanhydrid 8 Stunden im Schliffkolben am Rückflußkühler in gelindem Sieden erhalten. Nach dem Absaugen durch einen Glasgoochtiegel wurde zuerst mit Essigsäureanhydrid, dann mit Eisessig und Wasser gewaschen. Darauf wurde das Acetylprodukt

über Nacht in Wasser stehen gelassen. Durch öfteres Erneuern des Wassers wurde die Essigsäure ganz entfernt. Dann wurde in der üblichen Weise mit Alkohol und Äther behandelt und getrocknet.

Die Acetylprodukte besitzen die Farbe des Ausgangsmaterials. Die Gewichtszunahme gibt den ungefähren Acetylgehalt an.

Zur genauen Bestimmung des Acetylgehaltes wurden 0,2 - 0,3 g Acetylsporopollenin mit 25 ccm $^1/_5$ n alkoholischer Kalilauge im Schliffkolben 7 Stunden unter Rückfluß gekocht. Dann wurde Phenolphtalein zugesetzt und unter Umschwenken mit 1/10 n Salzsäure zurücktitriert. Gegen das Ende der Titration muß man stets einige Zeit warten, da die Kalilauge aus den Membranen langsam nachdiffundiert und so nach einiger Zeit wieder Rotfärbung auftritt. Zur Titerstellung wurde jedesmal ein Blindversuch mit 25 ccm 1/5 n alkoholischer KOH gemacht, die ebenfalls 7 Stunden im gleichen Schliffkolben gekocht wurde. Für die Bestimmung des Acetylgehaltes muß der Aschengehalt des Acetylsporopollenins berücksichtigt werden.

a) Dactylis glomerata $C_{90}H_{122}O_{11}(OH)_{12}$.

0,2712 g Acetylpollenin
0,2681 g aschefrei verbrauchten 15,8 ccm 1/10 n HCl

0,3206 g
0,3168 g aschefrei verbrauchten 18,3 ccm 1/10 n HCl

Berechnet für 12 Acetylgruppen	24,72 %	CH_3CO—
Gefunden	25,34 %	CH_3CO –
	24,84 %	CH_3CO--

b) Lycopodium clavatum aus dem Aquarium $C_{90}H_{125}O_{15}(OH)_{13}$.

0,3025 g Acetylsporonin
0,3003 g aschefrei verbrauchten 17,3 ccm 1/10 n HCl

0,3438 g
0,3413 g aschefrei verbrauchten 20,05 ccm 1/10 n HCl

Berechnet für 13 Acetylgruppen	25,25 %	CH_3CO—
Gefunden	24,77 %	CH_3CO—
	25,25 %	CH_3CO—

c) Corylus avellana 2 Monate gefault, $C_{90}H_{123}O_8(OH)_{15}$,
resp. $C_{90}H_{125}O_8(OH)_{15}$.

0,2566 g Acetylpollenin
0,2527 g aschefrei verbrauchten 17,1 ccm 1/10 n HCl

Berechnet für 15 Acetylgruppen auf	$C_{90}H_{138}O_{23}$	29,09 %	CH_3CO-
	$C_{90}H_{140}O_{23}$	29,07 %	CH_3CO-
Gefunden		29,10 %	CH_3CO-

Von Selaginella konnte aus Materialmangel keine Acetylbestimmung ausgeführt werden.

II. Teil

Untersuchungen zur Konstitution des Lycopodiumsporonins

Einleitung

Die Sporopollenine zeichnen sich durch große Widerstandsfähigkeit gegen Säuren und Laugen aus. Von Oxydationsmitteln jedoch werden sie leicht angegriffen. Die bisherigen Versuche zur Konstitutionsermittlung beruhen deshalb vorwiegend auf oxydativem Abbau der Sporopollenine. *Zetzsche* und *Huggler* (3) oxydierten mit Kaliumpermanganat in alkalischem Medium. Dabei erhielten sie neben viel Kohlendioxyd ungefähr 30 % des Ausgangsmaterials als Oxalsäure. In saurem Medium entstand überhaupt nur Kohlendioxyd. Essigsäure wurde nicht aufgefunden. Bei der Oxydation mit Chromsäure in Eisessig waren ebenfalls keine Zwischenprodukte faßbar. Bei der Oxydation mit Salpetersäure fanden Zetzsche und Huggler neben ungefähr 20 % Oxalsäure Gemische wasserunlöslicher Stoffe von saurem Charakter, die teils ölig, teils harzig und leicht zersetzlich waren und sich nicht näher charakterisieren ließen. Milde Oxydationsmittel wie Wasserstoffperoxyd in Eisessig führten nur zur Aufnahme von Sauerstoff oder Hydroxylgruppen in das Sporopolleninmolekül. Durch Kalischmelze entstanden teils alkalilösliche, teils harzige Produkte, die wegen ihrer unerfreulichen Eigenschaften nicht weiter untersucht wurden.

Außer diesen Oxydationsmethoden wandten Zetzsche und Huggler zur nähern Charakterisierung der Sporopollenine noch die Zinkstaubdestillation und die Dehydrierung mit Schwefel an. Beide Operationen erwiesen sich aber als wenig geeignet zur Konstitutionsermittlung. Ungeeignet erwies sich auch die Oxydation des Lycopodiumsporonins mit 86%iger Schwefelsäure und 30%igem Wasserstoffperoxyd. Die Entfernung der großen Mengen

Schwefelsäure war nur schwierig durchzuführen. Durch Extraktion mit verschiedenen Lösungsmitteln erhielten wir sehr kleine Fraktionen teils öliger, teils mit fester Substanz gemischter Körper, die nicht weiter untersucht wurden.

Kalt (2) führte den oxydativen Abbau mit Ozon durch. Das Gemisch der Ozonide hydrolysierte und oxydierte er, und aus dem entstandenen Säuren- und Ketongemisch versuchte er über die Blei- und Zinksalze einzelne Abbauprodukte zu isolieren. Er stellte als Abbauprodukt Bernsteinsäure fest. Im übrigen gelang es nicht, die Gemische der verschiedenen Salze zu trennen.

In der Folge versuchten wir bei unserm Abbau des Lycopodiumsporonins mit Ozon das erhaltene Säurengemisch nicht über die Salze, sondern über die Methylester zu trennen.

Ozonabbau des Lycopodiumsporonins

Sporonin von Lycopodium clavatum wurde in Eisessig suspendiert und der Ozonisierung unterworfen. Dabei gingen 95 % des Sporonins in Lösung. Der unlösliche Anteil bestand aus grauweißen Flocken, die unter dem Mikroskop teilweise die trümmerhafte Struktur des Sporonins zeigten. Wahrscheinlich besteht er aus sandigen und tonigen Verunreinigungen, die bei der Aufarbeitung großer Sporenmengen nur schwer ganz entfernt werden können. Die hellgelbe Lösung der Ozonide in Eisessig wurde mit Wasser verdünnt und mit Wasserstoffperoxyd versetzt, um die Ozonide zu spalten und womöglich in die Säuren zu verwandeln. Darauf wurde im Vakuum von Essigsäure und überschüssigem Wasserstoffperoxyd durch mehrmaliges Nachdestillieren mit Wasser befreit. Das hydrolysierte und oxydierte Ozonidgemisch bildete in der Wärme ein hellgelbes Öl von buttersäureähnlichem Geruch, das in der Kälte zu einem großen Teil in kleinen weißen Kristallen erstarrte.

Durch Perforieren mit Äther trennten wir das Material in einen ätherlöslichen und einen ätherunlöslichen Anteil.

Der ätherlösliche Anteil bestand aus einer weißen Kristallmasse und einem kleinen Anteil eines hellgelben Öles. Er hatte

nuß- bis pilzartigen Geruch. Wir veresterten das Gemisch und beabsichtigten die dargestellten Methylester durch fraktionierte Destillation zu trennen.

Zur Darstellung der Methylester erwies sich am geeignetsten die Veresterung in Methanol in der Siedehitze unter Einleiten von Chlorwasserstoff. Ein Veresterungsversuch mit Diazomethan ergab ein unbefriedigendes Resultat. Die Methylester wurden der Vakuumdestillation unterworfen. Rund zwei Drittel ihrer Menge waren im gewöhnlichen Vakuum destillierbar. Sie gingen zwischen 70 –150 ^{0} bei 10—11 mm über und wurden in Fraktionen von 10 zu 10 Grad aufgefangen. Wir arbeiteten die Ozonide in 4 Portionen auf und erhielten aus den ätherlöslichen Teilen jeweilen die entsprechenden Esterfraktionen. Das restliche Drittel der Methylester ließ sich im Hochvakuum nicht unzersetzt destillieren.

Bei der unvollständigen Veresterung mit Diazomethan erhielten wir als Produkt der Vakuumdestillation u. a. eine weiße kristallisierte Substanz, die sich aus Chloroform umkristallisieren ließ. Sie hatte einen Schmelzpunkt von 119 ^{0} und wir identifizierten sie nach der Elementaranalyse und ihren Eigenschaften als Bernsteinsäureanhydrid.

Der ätherunlösliche Anteil des Ozonidgemisches bildete eine honiggelbe, durchsichtige und lackartige Substanz, die in Wasser fast völlig löslich war. Veresterungsversuche mit Dimethylsulfat und Diazomethan verliefen erfolglos. Mit Methanol und Chlorwasserstoff waren die Resultate unbefriedigend. Es bildete sich nur eine kleine Menge Ester und davon war bloß ein Drittel im gewöhnlichen Vakuum destillierbar. Die Vakuumdestillation lieferte Esterfraktionen, die den aus dem ätherlöslichen Anteil erhaltenen entsprachen. Die restlichen zwei Drittel ließen sich im Hochvakuum nicht unzersetzt destillieren. Versuche, das Substanzgemisch, welches vermutlich aus Polyoxysäuren bestand, mit Jodwasserstoffsäure zu reduzieren, erwiesen sich als wenig geeignet zur weitern Aufarbeitung.

Wir trennten nun die Hauptmenge des ätherunlöslichen Anteils durch Ausziehen mit Essigester in einen essigesterlöslichen Anteil und einen essigesterunlöslichen Anteil, der in Wasser völlig löslich war.

Der essigesterlösliche Anteil bildete eine durchsichtige, rot gefärbte, sehr viskose Substanz, die auch bei längerm Stehen nicht kristallisierte. Eine Probe davon unterwarfen wir der Veresterung, die jedoch unbefriedigend verlief. Die Substanz wurde nicht weiter untersucht.

Der essigesterunlösliche, wasserlösliche Anteil wurde über die Bariumsalze in weitere Fraktionen zerlegt.

Der Anteil der wasserunlöslichen Bariumsalze war gering. Dieselben wurden mit Methyljodid verestert und lieferten ein gelbes Öl, das beim Stehen in weißen Kriställchen erstarrte. Es wurde wegen der geringen Menge nicht weiter untersucht.

Die wasserlöslichen Bariumsalze trennten wir durch Fällen mit Methanol in 3 Anteile:

Mit wenig Methanol erhielten wir eine leicht braun gefärbte, sehr hygroskopische Substanz, deren Bariumgehalt wir nach dem Trocknen zu 42,4 % bestimmten. Das Aequivalentgewicht der Säure beträgt demnach 93,2.

Mit überschüssigem Methanol fällten wir eine weiße, ebenfalls hygroskopische Substanz, die nach dem Trocknen analysiert wurde. Aus den Analysenwerten errechneten wir ihre Formel zu $C_7H_{10}O_6Ba$. Die in Methanol und Wasser leicht löslichen Bariumsalze bildeten eine gelbrote, glasige Substanz. Ihr Bariumgehalt betrug 37,9 %, das Aequivalentgewicht der dazugehörigen Säure berechneten wir zu 112,1. Aus diesen Bariumsalzen wurden die Säuren in Freiheit gesetzt. Sie bildeten eine braunrote, syrupöse Substanz, die bei längerm Stehen nur zu einem kleinen Teil kristallisch erstarrte. Sie wurde nicht weiter untersucht.

Insgesamt ozonisierten wir 289 g Sporonin, woraus wir als hydrolisiertes und oxydiertes Ozonidgemisch 254,5 g, d. h. 88 % des angewandten Sporonins erhielten. Davon waren 125 g, d. h. 49,1 % oder 43,2 % des Sporonins in Äther löslich. Der ätherunlösliche Anteil betrug insgesamt 108,6 g, d. h. 42,6 % des Ozonidgemisches oder 37,5 % des Sporonins. Aus dem ätherlöslichen Anteil isolierten wir 98,4 g Methylester, d. h. 79 %. Nicht veresterbar waren rund 20 % Substanz. Diese bildete ein dunkelbraunes Öl, das nicht weiter untersucht wurde. Aus dem ätherunlöslichen Anteil erhielten wir aus 19,1 g ca. 11 g Methylester, d. h.

57 %. Von 78 g ätherunlöslicher Substanz gingen 46,7 g, d. h. 59,5 % in den Essigester.

Von den aus dem ätherlöslichen und ätherunlöslichen Anteil hergestellten Methylestern wurden nun die entsprechenden Fraktionen vereinigt. Durch mehrmaliges Destillieren im Vakuum suchten wir sie zu reinigen. Es gelang uns jedoch nicht, reine Fraktionen herzustellen. Wenn eine Fraktion auch in einem sehr kleinen Temperaturintervall siedete, so ging sie bei wiederholter Destillation doch stets in einem größern Temperaturintervall über.

Einzelne der Esterfraktionen wurden der Elementaranalyse unterworfen. Da es sich um Mischfraktionen handelte, lieferten die Analysen nur Durchschnittswerte, die uns immerhin einen Einblick in die ungefähre Molekulargröße und den Sauerstoffgehalt der Ester erlaubten. Einzig der Bernsteinsäuredimethylester, der in größern Mengen vorliegt, wurde von uns in reiner Form isoliert. Die Analysenwerte dieses Esters stimmten denn auch mit den theoretischen Werten sehr gut überein.

Da uns die Reinigung der Methylester nicht gelang, versuchten wir nun aus ihnen Derivate herzustellen, die kristallisiert und leicht zu reinigen sein sollten. Geeignet dafür schienen uns die Säureamide, die durch Behandlung der Ester mit Ammoniak leicht herzustellen sind und im allgemeinen gut kristallisieren.

Wir führten deshalb die einzelnen Esterfraktionen in die Amide über. Zur Isolierung und Reinigung der dargestellten Säureamide benutzten wir die Methoden der fraktionierten Kristallisation. Bei der Amiddarstellung entstanden als Nebenprodukte leicht oxydable Leukoverbindungen, die unter der Einwirkung des Luftsauerstoffs in grüne bis blauschwarze Farbstoffe übergingen. Vermutlich lagen Ester von Ketosäuren vor, die mit Ammoniak zur Bildung von Heterozyklen führten. Schon bei den Esterfraktionen mit einem Siedepunkt über 96° bei 11 mm Druck machten sich diese Farbstoffe sehr störend bemerkbar. Die Ausbeute an Amiden war infolge des durch die Farbstoffe verursachten Materialverlustes sehr gering. Mit steigendem Siedepunkt der Ester nahm bei der Amiddarstellung die Menge der Farbstoffe stark zu und aus Esterfraktionen mit Siedepunkten über 120° gingen sie als das Hauptprodukt der Reaktion mit Ammoniak her-

vor. Es gelang uns, aus den verschiedenen Esterfraktionen eine Reihe von Amiden zu isolieren. Meist erhielten wir ein und dasselbe Amid aus mehreren aufeinanderfolgenden Esterfraktionen. Aus jeder Gruppe von identischen Amiden unterwarfen wir einen Vertreter der Elementaranalyse. Die aus den Analysen berechneten Bruttoformeln, die Schmelzpunkte der Amide und ihre sonstigen Eigenschaften erlaubten uns nun, die Mehrzahl der Amide zu identifizieren. Wir stellten die in der Literatur angegebenen entsprechenden Amide dar und prüften die Mischschmelzpunkte.

In der Tabelle auf der nachfolgenden Seite finden sich die Eigenschaften der Amide und ihre Mischschmelzpunkte zusammengestellt.

Als wohl definierte Abbauprodukte des Lycopodiumsporonins wurden auf Grund der Ester- und Amidanalysen folgende Säuren festgestellt:

1. Malonsäure als Diamid $C_3H_6O_2N_2$.
2. Bernsteinsäure als a) Anhydrid $C_4H_4O_3$,
   b) Dimethylester $C_6H_{10}O_4$,
   c) Diamid vom Smp. 242—243 °,
   d) Succinimid $C_4H_5O_2N$.
3. Glutarsäure als Diamid $C_5H_{10}O_2N_2$.
4. Adipinsäure als a) Diamid $C_6H_{12}O_2N_2$,
   b) vermutliches Esteramid $C_7H_{13}O_3N$.

Von den analysierten Esterfraktionen stellte nur der Bernsteinsäuredimethylester eine reine Substanz dar. Die andern Esterfraktionen erwiesen sich als Estergemische. Über die im Hochvakuum nicht destillierbaren Ester läßt sich bis jetzt nichts weiter aussagen. Vermutlich sind sie sauerstoffreicher als die im gewöhnlichen Vakuum destillierten Ester.

Auch über die Substanzen des ätherunlöslichen Anteiles der Ozonide läßt sich bis jetzt sehr wenig aussagen. Die Analyse des Bariumsalzes zeigt, daß es sich um verhältnismäßig niedrigmolekulare Säuren handeln muß, die außer dem Carboxylsauerstoff noch weitern Sauerstoff enthalten. Wenn man annimmt, das vorliegende Salz $C_7H_{10}O_6Ba$ stelle einen einheitlichen Körper dar,

Amid	Formel	Name	Smp. gef.	Smp. Lit.	Misch-Smp.	Eigenschaften
II a	$C_3H_6O_2N_2$	Malonsre-diamid	170—171°	170°	170°	Weiße quadrat. und prismat. Krist. (Dimorphie). Unlösl. in abs. Alkohol, zieml. leicht lösl. in Wasser.
II b	$C_4H_8O_2N_2$	Bernsteinsre-diamid	242 - 243°	242 - 243°	242—243°	Weiße nadelförm. Krist. Unlösl. in Äther und abs. Alkohol. Schwer lösl. in Wasser.
IV b	$C_5H_{10}O_2N_2$	Glutarsre-diamid	173 - 174°	175°	174 - 175°	Glänzende, farblose Blättchen. In Alkohol zieml schwer lösl.
IX a	$C_6H_{12}O_2N_2$	Adipinsre-diamid	220°	220°	220°	Weiße Krist. Unlösl. in abs. Alkohol, schwer lösl. in Wasser.
III c	$C_4H_5O_2N$	Succinimid	117°	125°	—	Farblose Kriställchen. In Alkohol, Äther und Wasser leicht lösl., in Benzol schwer lösl.
VII c	$C_7H_{13}O_3N$	vermutl. Adipinsre-methylester-amid	90°	—	—	Weiße flimmernde Nädelchen, die zu Blättchen zusammenfilzen. Leicht lösl. in Wasser, Alkohol, Äther, Chloroform, Essigester, Aceton, Benzol. Umkristallisierbar aus Xylol.

was nicht sehr wahrscheinlich ist, so dürfte es sich um eine Dioxypentandicarbonsäure handeln.

Damit das Lycopodiumsporonin beim Abbau durch Ozon die Malon-, Bernstein-, Glutar- und Adipinsäure liefern kann, müssen in ihm Gruppierungen vorliegen, aus denen beim Abbau leicht die betreffenden Säuren entstehen können. Wir müssen somit im Lycopodiumsporonin Gruppierungen wie

$$= CH - CH_2 - CH =$$
$$= CH - CH_2 - CH_2 - CH =$$
$$= CH - CH_2 - CH_2 - CH_2 - CH =$$
$$= CH - CH_2 - CH_2 - CH_2 - CH_2 - CH =$$

annehmen. Oxalsäure wurde unter den Abbauprodukten nicht aufgefunden. Sie müßte bei allfälligem Vorliegen durch die H_2O_2-Oxydation in saurer Lösung zu CO_2 abgebaut werden. Wie *H. Lindlar* festgestellt hat, kommt sie in den Ozoniden in Form des Dialdehyds nicht vor. Das Sporonin enthält also keine $CH - CH =$ Gruppierungen.

Malonsäure ist schon wiederholt durch Oxydation organischer Verbindungen festgestellt worden. In der Terpenreihe wurde sie durch saure Permanganatoxydation von Abietinsäure gefunden. Auch Bernsteinsäure wurde schon öfters bei der Oxydation von Terpenen festgestellt. Glutarsäure entsteht beim oxydativen Abbau von Cyclohexan und Cyclohexanon. Adipinsäure wurde beim Ozonabbau von Cyclohexen gefunden. (Vgl. *Beilstein,* 4. Aufl. II.)

Den Gehalt der Ozonidspaltungsprodukte des Lycopodiumsporonins an Bernsteinsäure bestimmten wir quantitativ. Die Bestimmung gründet sich auf die Beständigkeit der Bernsteinsäure gegen saure Permanganatlösung. Drei Gramm ozonisiertes Sporonin wurde wie üblich hydrolysiert und mit H_2O_2 oxydiert. Dann wurde angesäuert und mit Permanganat oxydiert. Der gebildete Braunstein wurde mit SO_2 gelöst, die Lösung eingeengt und dann während 12 Stunden mit Äther perforiert. Der Ätherrückstand wurde durch Extraktion mit Chloroform gereinigt. Er wurde als reine Bernsteinsäure identifiziert.

3 g Sporonin lieferten 0,485 resp. 0,434 g Bernsteinsäure, was auf das Sporoninmolekül umgerechnet einen Gehalt von 2 Molen Bernsteinsäure bedeutet.

Das Auftreten der Bernsteinsäure bei der Permanganatoxydation der Ozonidspaltungsprodukte würde keine konstitutionellen Schlüsse zu ziehen erlauben, wenn sie nicht schon vor der Oxydation mit Permanganat direkt in den Ozonisationsprodukten enthalten wäre. So dient ihr Auftreten nicht bloß als eine weitere Stütze der vermutlichen Terpennatur der Sporopollenine, sondern sie beweist das Vorhandensein von je 2 $-CH-CH_2-CH_2-CH=$ Gruppierungen pro Mol Sporonin.

Schätzungsweise kommen auf ein Mol Sporonin 1 Mol Malonsäure, 1 Mol Adipinsäure und 1—2 Mole Glutarsäure. Nach *Kalt* sind ferner pro Mol Sporonin 2 C-Methylgruppen vorhanden. Von den 90 C-Atomen des Sporoninmoleküls sind somit 26—31 C-Atome, d. h. rund ein Drittel, näher festgelegt.

Der ganze Verlauf der Ozonisation und der Charakter der Ozonidspaltungsprodukte ähneln stark denjenigen des Kautschuks. Nach den bisherigen Ergebnissen darf angenommen werden, daß die Sporopollenine wohl nicht auf einen einheitlichen Grundkörper zurückgeführt werden können, sondern daß mehrere heterogene Körper die Bausteine des Sporopolleninmoleküls bilden.

Beim Vergleich der Abbauprodukte des Lycopodiumsporonins durch Ozon mit denjenigen der fossilen Sporonine Tasmanin und Lange-Sporonin, die von *E. Ziegler* (6) untersucht wurden, ergibt sich folgendes: Die Abbauprodukte des Tasmanins sind im Gegensatz zu denjenigen des Lycopodiumsporonins und des Lange-Sporonins hauptsächlich hochmolekulare Körper. Der niedermolekulare Anteil betrug beim Tasmanin nur ca. 25 % der Ozonisationsprodukte. Aus ihm wurden die Säuren $C_4H_6O_4$, $C_5H_8O_4$, $C_6H_{10}O_4$, $C_7H_{12}O_5$ und $C_7H_{10}O_5$ isoliert. Den Hauptanteil bildete die Bernsteinsäure $C_4H_6O_4$. Die andern Säuren wurden von *Ziegler* nicht näher charakterisiert. In der Säure $C_5H_8O_4$ muß nach dem Siedepunkt ihres Methylesters von 87° bei 11 mm Druck und da es sich nach der Bestimmung des Methoxylgehaltes nur um eine Dicarbonsäure handeln kann, die beim Lycopodiumsporonin ebenfalls aufgefundene Glutarsäure vorliegen. Aus den gleichen Gründen muß die Säure $C_6H_{10}O_4$ Adipinsäure sein. Die Säuren unbekannter Konstitution $C_7H_{12}O_5$ und $C_7H_{10}O_5$ wurden beim Abbau des Lycopodiumsporonins bis jetzt nicht aufgefunden. Interessant

ist die Tatsache, daß Malonsäure unter den Abbauprodukten des Tasmanins nicht gefunden wurde.

Sowohl Tasmanin wie Lange-Sporonin lieferten Bernsteinsäure als Abbauprodukt. Im Tasmanin wurden pro Mol Sporonin 4—5 Mol Bernsteinsäure gebildet, während beim Lange-Sporonin 2 Mol wie beim rezenten Lycopodiumsporonin entstanden.

Der oxydative Abbau der bis jetzt untersuchten Sporonine zeigt, daß durch die Inkohlung der Grundcharakter der Sporopollenine nicht tiefgreifend geändert wird, da Bernsteinsäure bei allen als Abbauprodukt entsteht. Schon die von *Kalt* bestimmten C-Methylwerte zeigen keine grundlegenden Unterschiede zwischen den rezenten und fossilen Sporopolleninen.

Tasmanin als ein fossiles Sporonin sapropelitischer Herkunft und Lange-Sporonin von humitischer Herkunft unterscheiden sich vor allem durch die molekulare Größe ihrer Abbauprodukte. Lange-Sporonin liefert wie das rezente Lycopodiumsporonin hauptsächlich niedermolekulare Körper, Tasmanin hauptsächlich hochmolekulare. Die Sapropelierung scheint demnach, soweit die bisherigen Untersuchungen verallgemeinert werden dürfen, mit einer Zyklisierung ursprünglich vorhandener Doppelbindungen verbunden zu sein. Die Inkohlung als ein Dehydratations- und Dehydrierungsprozeß muß zur Entstehung ungesättigter Systeme führen, denen vielleicht eine Zyklisierung vorangegangen ist. Weitere Schlüsse über die Veränderungen der Sporopollenine bei der Fossilierung werden sich erst nach dem nähern Eindringen in ihre Konstitution und aus der Untersuchung weiterer rezenter und fossiler Sporopollenine ziehen lassen.

Experimenteller Teil

Der Ozonisationsapparat lieferte bei einer Spannung von 13—15 000 Volt und einer Sauerstoffströmungsgeschwindigkeit von 0,3—0,5 Liter pro Minute in der Stunde ca. 2 g Ozon. Zur Aufnahme des Sporonins dienten mit Glasschliffen versehene Waschflaschen, die in einer Batterie bis zu 10 Flaschen an die Ozonisationsapparatur angeschlossen wurden. Die Schliffe wurden mit reinstem Paraffin gedichtet. Jede Waschflasche wurde mit 60 ccm reinstem Eisessig beschickt und darin je 3 g Sporonin von Lycopodium clavatum, das zuerst längere Zeit über Phosphorpentoxyd getrocknet worden war, suspendiert. Das Sporonin quoll anfangs im Eisessig stark auf und nahm eine dunkelbraune Farbe an. Durch Einwirkung des Ozons wurden die an den Flaschenwänden klebenden braunen Teilchen der Suspension bereits nach 2 Stunden weiß. Nach etwa 10stündiger Ozoneinwirkung hellte sich die dunkelbraune Farbe der Suspension stark auf, ging dann allmählich in hellgelb, schließlich in sehr hellgrau über. Diese grauweißen Suspensionen wurden noch solange mit Ozon behandelt, bis augenscheinlich keine Aufhellung mehr eintrat und keine Teilchen mehr in Lösung gingen. Beim Stehen über Nacht setzte sich die geringe Menge der ungelösten Teilchen ab, die überstehende Lösung war hellgelb gefärbt. Gewöhnlich wurden die zwei vordersten Flaschen der Batterie miteinander entfernt. Ihr Inhalt wurde in einen Stehkolben geschüttet und die Waschflaschen mit Eisessig nachgespült. Die Flaschen wurden sogleich mit frischem Material beschickt und hinten an die Batterie angeschlossen. Zwei solche Flaschen brauchten ca. 90 Stunden Ozoneinwirkung, bis sie allmählich nach vorn gerückt und fertig ozonisiert waren.

Aufarbeitung der Ozonide

Die Lösung der Ozonide in Eisessig wurde mit Wasser verdünnt, so daß eine 70%ige Essigsäure entstand. In diese Lösung

wurden auf je 100 ccm Flüssigkeit 8 ccm 30%iges Wasserstoffperoxyd gegeben und 48 Stunden bei Zimmertemperatur stehen gelassen, um die Ozonide zu spalten und in die Säuren zu verwandeln. Darauf wurde noch 6 Stunden auf einem lebhaft siedenden Wasserbad erwärmt und heiß filtriert. Der hellgraue Rückstand war schleimig, beim Trocknen an der Luft wurde er hart und spröde. Sein Gewicht betrug 5—6 % der Einwage, wenn reines Sporonin zur Ozonisation verwendet wurde. Wenn, wie es später durchgeführt wurde, die aus Sporonin plus Cellulose bestehenden Membranen der Ozonisation unterworfen wurden, so war der Rückstand entsprechend größer.

Das Filtrat, eine hellgelbe, grünstichige Flüssigkeit, wurde bei 50—55° Wasserbadtemperatur im Vakuum von Essigsäure und überschüssigem Wasserstoffperoxyd befreit. Es wurde 4—5mal mit Wasser nachdestilliert, bis die Destillate keine Reaktion auf Wasserstoffperoxyd mehr zeigten und auch keine Essigsäure nachgewiesen werden konnte. Zum Schluß wurde solange destilliert, bis kein Wasser mehr vorhanden war. Die Destillate hatten einen eigentümlich dumpfen, kellerähnlichen Geruch, der von leicht flüchtigen Ozonidspaltungsprodukten herrühren mußte. Der Kolbenrückstand betrug durchschnittlich 86—90 % des angewendeten reinen Sporonins. Er bestand zur Hauptsache aus weißer kristallisierter Substanz neben einem geringern Anteil eines hellgelben klaren Öles. Sein Geruch erinnerte an Buttersäure. Er war in Wasser fast völlig löslich. Wir gewannen eine ätherlösliche und eine ätherunlösliche Fraktion, indem wir in wenig warmem Wasser aufnahmen und in den Perforator brachten, wo jeweilen mit ca. 500 ccm Äther während 12 Stunden perforiert wurde. Dann wurde die Ätherlösung von der leicht trüben wäßrigen Lösung getrennt und beide einzeln weiter verarbeitet.

A. Der ätherlösliche Anteil

Der sehr hellgelb gefärbte Äther wurde abdestilliert, zuletzt noch im Vakuum, um Spuren von Wasser, die beim Perforieren stets mitgerissen wurden, zu entfernen. Der Ätherrückstand bildete ein hellgelbes klares Öl, das beim Abkühlen zum größern Teil zu weißen Kriställchen erstarrte. Das Gewicht des ätherlöslichen

Anteiles betrug bei den einzelnen Aufarbeitungen durchschnittlich 40—45 % des eingewogenen Sporonins oder 45—50 % der zersetzten Ozonidgemische. Ihr Geruch war nuß- bis pilzartig.

Aus dem vorliegenden Säure- und Ketongemisch suchten wir nun durch Darstellung der Methylester eine Esterfraktion abzutrennen. Zur Herstellung der Ester bedienten wir uns verschiedener Verfahren. Am geeignetsten erwies sich die Veresterung in Methanol in der Siedehitze unter Einleiten von trockenem Chlorwasserstoff. Eine erste Portion des Säuregemisches, Bezeichnung A I, von 14,3 g wurde in der 10fachen Menge reinsten Methanols gelöst und im Schliffkolben unter Einleiten von trokkenem HCl während 8 Stunden verestert. Die beinahe farblose Lösung färbte sich dabei allmählich dunkler und wurde zuletzt dunkelrot. Das Methanol wurde nach beendeter Veresterung bis auf einen kleinen Rest abdestilliert und der rotbraune Rückstand unter Eiskühlung in Wasser gegossen. Diese wäßrige Emulsion der Methylester wurde dreimal ausgeäthert, wobei sich der Äther rotbraun färbte. Die Ätherlösung wurde mit wenig Natriumbicarbonatlösung und Wasser gewaschen und über Natriumsulfat getrocknet. Nach dem Abdestillieren des Äthers blieb ein Rückstand von 11,3 g als braunrote, angenehm riechende Flüssigkeit: Ester A I. Dieses Estergemisch versuchten wir durch Destillation im Vakuum zu fraktionieren:

Bezeichnung	Temp. innen	Temp. außen	Druck mm	Bemerkungen
1 A I	70— 82°	100—125°	13	0,5 g farblos klar
2 A I	82— 92°	125—133°	13	2,9 g farblos klar
3 A I	93—102°	134—143°	13	1,1 g farblos H. T. 93°
4 A I	103—132°	144—175°	13	1,3 g farblos klar
5 A I	133—142°	176—194°	13	1,2 g gelb ölig H. T. 138°

Der Kolbenrückstand betrug noch ca. 3 g: Rückstand A I.

Da beim Verestern mit Methanol und HCl eine teilweise Zersetzung eintrat, kenntlich an der Dunkelfärbung, versuchten wir eine zweite Portion des Säuregemisches mit Diazomethan zu verestern.

Die Portion A II von 15,7 g wurde zuerst während einiger Stunden im Vakuum bei einer Badtemperatur von 60° sorgfältig

getrocknet. Diese Badtemperatur darf nicht überschritten werden, sonst färbt sich der sehr hellgelbe Kolbeninhalt sofort bräunlich. Diazomethan wurde aus Hydrazinhydrat und Chloroform in Mengen von 2—3 g hergestellt und in absolutem Äther aufgefangen. Das gut getrocknete Säurengemisch wurde in Methanol aufgenommen und unter Eiskühlung portionsweise von der Diazomethanlösung zugegeben. Es fand Stickstoffentwicklung bis zum Schlusse statt. Die gelblich gefärbte Lösung wurde zuerst während 48 Stunden im Eisschrank stehen gelassen, dann durch Abdestillieren des Äthers eingeengt und mit frisch dargestellter Diazomethanlösung behandelt. Diese Behandlung wurde noch zweimal wiederholt, bis keine Stickstoffentwicklung mehr bemerkt wurde. Es schied sich dabei eine geringe Menge weißer amorpher Substanz aus, von der abfiltriert wurde. Sie wurde auf dem Glasfilter sogleich ölig und dunkelbraun und wurde nicht weiter untersucht. Nun wurde das Filtrat im Vakuum von Äther und Methanol befreit. Dabei wurde der rotbraune Rückstand, der 12,4 g betrug, zum Teil fest. Bei der Vakuumdestillation dieses Rückstandes erhielten wir die den Estern A I entsprechenden Fraktionen, die jedoch mengenmäßig geringer ausfielen. Einzig die Fraktion 4 A II, 133—143° bei 10 mm Druck war überraschend groß. Sie wog 4,9 g und war hellgelb und ölig. Beim Stehen über Nacht schieden sich aus ihr weiße nadelförmige Kristalle aus, die abgesaugt wurden. Der rohe Schmelzpunkt dieser Substanz lag bei 110°. Sie ließ sich aus Chloroform umkristallisieren, wobei der Schmelzpunkt auf 119° stieg und bei weiterm Umkristallisieren konstant blieb. Die Substanz wurde der Elementaranalyse unterworfen:

0,0470 g Substanz gaben 0,0826 g CO_2 und 0,0164 g H_2O
0,0422 g Substanz gaben 0,0741 g CO_2 und 0,0147 g H_2O

Gefunden	C = 47,93 %	H = 3,90 %
	C = 47,89 %	H = 3,90 %
Berechnet für $C_1H_4O_3$	C = 48,00 %	H = 4,00 %

Es mußte sich also bei dieser Substanz nach den Werten der Analyse, dem Schmelzpunkt und der Löslichkeit um Bernsteinsäureanhydrid handeln. Dieses konnte sich bei der Destillation aus nicht veresterter Bernsteinsäure bilden. Die Veresterung mit

Diazomethan war also recht unvollständig verlaufen, obschon wir einen Überschuß verwendet hatten. Wir vereinigten deshalb die Esterfraktionen A II mit dem noch recht beträchtlichen Rückstand der Vakuumdestillation und veresterten mit Methanol und Chlorwasserstoff. Diesmal veresterten wir in der Kälte um die durch Dunkelfärbung erkenntliche Zersetzung zu verhüten. Bei der längern Dauer der kalten Veresterung zeigten sich jedoch gegen Schluß die gleichen Zersetzungserscheinungen. Die nun isolierten Ester A II destillierten wir im Vakuum und stellten die den Estern A I auch mengenmäßig entsprechenden Esterfraktionen her. Durch Vereinigung entsprechender Fraktionen der Ester A I und A II und wiederholtes Fraktionieren hofften wir von den Estergemischen zu reinen Estern zu gelangen. Beispielsweise vereinigten wir die Fraktionen 2 A I, 82—92°, 13 mm, 1 A II, 79—92°, 12 mm und 1 B I, II, 60—90°, 11 mm. (Ester B siehe ätherunlöslicher Anteil). Die Summe dieser Fraktionen betrug 7,9 g.

Bezeichnung	Temp. innen	Temp. außen	Druck mm	Bemerkungen
1 D	44°	72 – 75°	13	Vorlauf 2 Tropfen
2 D	81— 85°	100—108°	13	2,3 g H. T. 82° farblos
3 D	86— 90°	109—116°	13	2,8 g H. T. 86—88° farblos
4 D	92—109°	117—150°	13	1,1 g farblos
5 D	110—130°	151—195°	13	1,2 g farblos

Die Esterfraktion 2 D, 81—85°, 13 mm, Hauptanteil bei 82°, wurde wieder fraktioniert:

2 Da	50— 75°	75 -105°	13	1 Tr.
2 Db	75— 79°	106—120°	13	1,5 g
2 Dc	80— 82°	121—140°	13	0,6 g

Fraktion 3 D, 86—90°, 13 mm, Hauptanteil bei 86—88°, wurde ebenfalls nochmals fraktioniert:

3 Da	76— 80°	98—114°	12	0,5 g
3 Db	81— 84°	115—123°	12	1,5 g
3 Dc	85— 88°	124—140°	12	0,5 g

Die Fraktionen 2 D c und 3 D b vereinigten wir und fraktionierten nochmals:

1 Z	76— 79°	98 -110°	12	0,7 g
2 Z	80— 82°	112—140°	12	0,7 g

Die Fraktionen 2 D b und 3 D a vereinigten wir ebenfalls zur weitern Fraktionierung:

Bezeichnung	Temp. innen	Temp. außen	Druck mm	Bemerkungen
3 Z	69— 73°	90—102°	12	2 Tr.
4 Z	74— 76°	103—112°	12	1,2 g
5 Z	77— 79°	114—150°	12	0,8 g

Wie aus den angeführten Beispielen ersichtlich ist, erhielten wir auch durch wiederholtes sorgfältiges Destillieren keine reinen Esterfraktionen. Da diese kleinen Mischfraktionen nicht weiter gereinigt werden konnten und da wir hofften, bei mengenmäßig größern Fraktionen günstigere Trennungsverhältnisse zu finden, so stellten wir aus inzwischen frisch ozonisiertem Sporonin weitere Methylester dar. Die gesamte Aufarbeitung des ätherlöslichen Anteiles der zersetzten Ozonidgemische führten wir in 4 Teilen durch. Teil I und II sind in den obigen Ausführungen in allen Einzelheiten beschrieben. Für Teil III und IV können wir uns darauf beschränken, anzugeben, daß aus 17 resp. 78 g ätherlöslichen Säuregemisches 12,7 resp. 62 g Methylester durch Verestern in Methanol unter Einleiten von HCl hergestellt wurden. Diese Ester A III und A IV destillierten wir im Vakuum und erhielten Fraktionen, die durchaus denjenigen der Ester A I entsprachen.

Die Rückstände der Vakuumdestillationen A I bis A IV, die normalerweise ein Drittel der Ester betrugen, vereinigten wir zum Schluß, veresterten sie nochmals gründlich und unterwarfen sie der Vakuumdestillation. Ein geringer Anteil ließ sich noch im gewöhnlichen Vakuum destillieren. Den Hauptanteil von 32,5 g unterwarfen wir der Hochvakuumdestillation: Bei einer Badtemperatur von 178—185° und einer Innentemperatur von 100—140° gingen ca. 0,5 g einer bräunlich gefärbten Substanz über. Der anfängliche Druck von 0,8 mm stieg dabei auf 4 mm an. Offensichtlich zersetzte sich die Substanz, und die Hochvakuumdestillation wurde deshalb abgebrochen.

Die Anteile der Veresterungsgemische, die nach beendeter Veresterung nicht ätherlöslich waren, sondern in der wäßrigen und methanolhaltigen Lösung zurückblieben, wurden im Vakuum

von Methanol und Wasser befreit. Sie betrugen ungefähr 20 % der ätherlöslichen Anteile. Sie bildeten braun gefärbte Öle, aus denen bei längerm Stehen sich geringe Mengen kristallisierter Substanzen ausschieden. Sie wurden nicht weiter untersucht.

B. Der ätherunlösliche Anteil

Die Fraktionen B bildeten gelbe lackartige Substanzen, die auch bei längerem Stehen nicht kristallin wurden. Sie waren fast völlig wasserlöslich.

Eine erste Portion, Bezeichnung B I, von 11,4 g versuchten wir mit Dimethylsulfat zu verestern. Diese Veresterung gab jedoch ein negatives Resultat. Deshalb schritten wir zur Veresterung mit Methanol und Chlorwasserstoff. Auf diese Weise erhielten wir 7,0 g braunroten Ester: Ester B I.

Eine zweite Portion, Bezeichnung B II, von 7,7 g versuchten wir mit Diazomethan zu verestern. Diese Veresterung verlief ebenfalls negativ. Aus der lackartigen Substanz konnte offenbar trotz stundenlangen Trocknens im Vakuum bei 60° das Wasser nicht völlig entfernt werden. Diese Temperatur durfte aber wegen der großen Temperaturempfindlichkeit der Substanz nicht überschritten werden. Vom Veresterungsversuch mit Diazomethan blieben 6,9 g einer dunkelroten, sehr zähflüssigen Substanz, die wir nun in der üblichen Weise mit Methanol und Chlorwasserstoff veresterten. Wir isolierten 4,0 g Methylester, welche wir mit den 7,0 g Estern B I vereinigten und der Destillation im Vakuum und Hochvakuum unterwarfen:

Bezeichnung	Temp. außen	Temp. innen	Druck mm	Bemerkungen
1 B I, II	60— 90°	90—138°	11	1,1 g farblos klar
2 B I, II	90—110°	139—163°	11	1,3 g farblos klar
3 B I, II	111—127°	164—190°	11	1,4 g farblos klar
4 B I, II	172—188°	238—318°	1,2 - 1,3	5,2 g gelb ölig
5 B I, II	190—202°	320—360°	1,2	1,3 g braun ölig

Der Kolbenrückstand bildete eine schwarze, pechartige Substanz von brenzligem Geruch. Die Hochvakuumfraktion 4 B I, II versuchten wir nochmals zu fraktionieren:

1 F	62—130°	106—180°	0,35	Geringer Vorlauf ölig
2 F	130—195°	181—240°	0,35	2,5 g gelb ölig
3 F	196—200°	241—270°	0,35	2,1 g braun ölig

Die Fraktion 4 B I, II erwies sich bei der zweiten Destillation als ganz uneinheitlich. Sie siedete kontinuierlich von 130—200°.

Die Fraktionen A hatten bei der Veresterung 79% Ester geliefert, wovon zwei Drittel im gewöhnlichen Vakuum destillierbar waren. Die Fraktionen B I und B II ergaben nur 57—60% Ester, wovon im gewöhnlichen Vakuum bloß ein Drittel destillierbar war. Infolge dieser ungünstigen Verhältnisse sahen wir bei den weitern Fraktionen B von einer direkten Veresterung ab. Wir stellten vorerst Versuche an, das Säuregemisch, welches vermutlich aus Polyoxysäuren bestand, in die Fettsäuren überzuführen durch Reduktion mit Jodwasserstoffsäure. Die Fraktion B III von 11,5 g lösten wir in 40 ccm Jodwasserstoffsäure vom spez. Gewicht 1,7 durch längeres Schütteln auf. Portionen von je 10 ccm dieser Lösung brachten wir mit je 3 g rotem Phosphor in Bombenrohre und erhitzten während 4 Stunden auf 160—170°. Nach beendeter Reaktion verdünnten wir mit Wasser und ätherten aus. Aus dem Äther isolierten wir eine geringe Menge eines rotbraunen Öles, das beim Stehen zum Teil auskristallisierte. Die wäßrige Lösung machten wir kongosauer und unterwarfen sie der Wasserdampfdestillation. Das Destillat machten wir alkalisch und isolierten daraus ein schmutzigweißes hygroskopisches Natriumsalz. Den Kolbenrückstand der Wasserdampfdestillation schüttelten wir mit Essigester aus und erhielten daraus ein braunes Öl, das bei längerm Stehen zum Teil kristallisierte. Die dargestellten Reduktionsprodukte erwiesen sich schon rein mengenmäßig und nach ihren Eigenschaften wenig geeignet zur weitern Trennung und Reinigung.

Eine vierte Portion der ätherunlöslichen Anteile, Fraktion B IV, von 78 g trennten wir vorerst in zwei Fraktionen durch Auskochen mit Essigester. Wir kochten viermal kurz mit insgesamt 250 ccm Essigester aus, wobei sich der Essigester rotgelb färbte. Er wurde abdekantiert, war noch leicht trübe, klärte sich aber beim Stehen über Nacht, wobei sich kleine Öltröpfchen am Boden und den Wänden des Kolbens absetzten. Davon gossen wir die klare Lösung ab und destillierten den Essigester im Vakuum ab. Der Rückstand, Bezeichnung Fraktion C, betrug 46,7 g und bil-

dete einen durchsichtigen rotgefärbten und sehr viskosen Syrup. Dieser wurde auch bei langem Stehen nicht kristallin.

5 g dieser Fraktion C veresterten wir mit Methanol und HCl. Wir erhielten 3,2 g Ester, wovon 1,6 g im gewöhnlichen Vakuum zwischen 80—110° bei 11 mm Druck übergingen. Der Rest ließ sich im Hochvakuum nicht unzersetzt destillieren. Der Hauptanteil der Fraktion C wurde nicht weiter untersucht.

Der in Essigester nicht lösliche Anteil der Fraktion B IV betrug 31 g. Er wurde mit den aus dem Essigester ausgeschiedenen Öltröpfchen vereinigt, in ca. 100 ccm Wasser aufgenommen und im Vakuum von Essigester befreit. Die wäßrige Lösung war braunrot und leicht trübe. Sie wurde deshalb filtriert. Auf dem Filter blieb ein sehr geringer bräunlicher und amorpher Rückstand, der nicht weiter untersucht wurde. Das Filtrat wurde auf ein siedendes Wasserbad gebracht und unter Rühren portionsweise solange festes Bariumkarbonat eingetragen, bis keine CO_2-Entwicklung mehr sichtbar war. Die gefällten Bariumsalze wurden abgenutscht und über Schwefelsäure im Exsikkator getrocknet. Bezeichnung B IV a.

Das schwarzbraune Filtrat der Bariumsalze wurde durch Kochen mit Tierkohle etwas aufgehellt. Dann wurde auf dem Wasserbad zur Trockne eingedampft. Es ergab sich ein noch wasserhaltiger brauner Lack von caramelartigem Geruch. Dieser wurde wieder in Wasser gelöst und solange mit Barytlauge gefällt, als sich noch ein Niederschlag bildete. Dieser Niederschlag war hellbraun und betrug 0,5 g; Bezeichnung B IV b. Im Filtrat wurde überschüssiges $Ba(OH)_2$ mit CO_2 entfernt. Das Filtrat wurde auf 40 ccm eingeengt, wobei aber auch in der Kälte nichts mehr ausfiel. Jetzt wurde wieder mit Wasser verdünnt, mit Methanol in kleinen Portionen gefällt. Der Niederschlag war leicht braun, flockig und hygroskopisch; Bezeichnung B IV c. Er wurde nach dem Absaugen rasch in Methanol gebracht, nach eintägigem Stehen schnell abgesaugt und in den Vakuumexsikkator über P_2O_5 gebracht.

Im Filtrat wurde mit viel überschüssigem Methanol ein weißer, flockiger Niederschlag gefällt; Bezeichnung B IV d. Diese Substanz war ebenfalls hygroskopisch und wurde wie Substanz B IV c behandelt. Das Filtrat der Substanz B IV d wurde vom Me-

thanol befreit und in einer Kristallisierschale eingedampft. Es blieb ein gelbroter, glasiger Rückstand, der ca. 6 g betrug; Bezeichnung B IV e.

Substanz B IV a = wasserunlösliche Ba-Salze.

Diese Substanz wurde mit Methyljodid in Methanol verestert durch mehrstündiges Kochen am Rückflußkühler. Nach dem Abfiltrieren des gebildeten Bariumjodids destillierten wir das Methanol ab und erhielten einen dunkelbraunen Rückstand von 2 g, der mit Äther ausgezogen wurde. Aus dem Äther isolierten wir eine hellgelbe, ölige Substanz, die beim Stehen zu weißen, hygroskopischen Kriställchen erstarrte. Sie wurde nicht weiter untersucht.

Substanz B IV c = methanolunlösliche Ba-Salze.

Die Substanz wurde in der Trockenpistole während 8 Stunden bei 100° getrocknet. Dann wurde eine quantitative Bariumbestimmung ausgeführt: 0,2064 g Substanz gaben 0,1488 g $BaSO_4$, d. h. 42,43 % Ba. Das dazugehörige Äquivalentgewicht der Säure berechneten wir zu 93,19.

Substanz B IV d = methanolschwerlösliche Ba-Salze.

Die Substanz wurde in der Trockenpistole getrocknet. 0,2083 g Substanz gaben 0,1471 g $BaSO_4$, d. h. 41,56 % Ba. Das dazugehörige Äquivalentgewicht der Säure beträgt demnach 96,58.

Die Elementaranalyse ergab folgende Werte:

4,818 mg Substanz gaben 4,500 mg CO_2 und 1,350 mg H_2O

Gefunden	C = 25,48 %	H = 3,13 %	Ba = 41,56 %
Berechnet für $C_7H_{10}O_6Ba$	C = 25,66 %	H = 3,08 %	Ba = 41,97 %

Substanz B IV e = methanollösliche Ba-Salze.

0,1803 g Substanz gaben 0,1164 g $BaSO_4$, d. h. 37,99 % Ba. Das Äquivalentgewicht der Säure beträgt demnach 112,1. Die Säure wurde aus dem Bariumsalz mit der berechneten Menge n H_2SO_4 in Freiheit gesetzt. Vom gebildeten Bariumsulfat wurde abfiltriert und das Filtrat im Vakuum bei 60° Badtemperatur von Wasser befreit. Der Rückstand bildete eine braunrote, syrupöse Substanz, die bei längerm Stehen im Eisschrank nur zu einem kleinen Teil kristallisch erstarrte. Sie wurde nicht weiter untersucht.

Fraktionierung des Estergemisches durch Vakuumdestillation

Wir vereinigten alle die kleinen Fraktionen der Ester A und Ester B, die zwischen 75—92° bei 11—13 mm Druck übergegangen waren. Ihre Summe betrug 24 g. Sie wurden sehr sorgfältig im Vakuum destilliert und ergaben folgende Fraktionen:

Bezeichnung	Temp. innen	Temp. außen	Druck mm	Bemerkungen
E 1	45 — 73°	90— 95°	11	0,2 g klar farblos
E 2	74 — 76°	96— 97°	10—11	1,5 g Hauptanteil 76°
E 3	77 — 78°	98—100°	10—11	2,7 g Hauptanteil 77,5°
E 4	78,5— 80°	101—105°	10—11	3,3 g Hauptanteil 79°
E 5	80 — 83°	105—109°	10—11	7,2 g Hauptanteil 81—82°
E 6	84 — 87°	105—111°	10—11	1,6 g
E 7	87 — 90°	111—112°	10—11	1,9 g Hauptanteil 88,5°
E 8	91 — 94°	113—116°	10—11	1,0 g
E 9	95,5— 99°	117—122°	10—11	1,1 g

Die Fraktionen E waren alle klar und farblos.
Der Rückstand von der Destillation betrug 3 g.

Vereinigt wurden die Fraktionen der Ester A und B, welche zwischen 92—110° bei 11—13 mm übergegangen waren. Dazu gaben wir noch die Fraktionen E 8 und E 9 sowie den Destillationsrückstand E. Die Summe dieser Estergemische betrug 24 g.

Fraktion	Temp. innen	Temp. außen	Druck mm	Bemerkungen
G 1	77 — 83°	103—111°	10—11	1,8 g Hauptanteil 82,5°
G 2	83,5—86,5°	112—114°	10—11	5,5 g Hauptanteil 84,5°
G 3	87 — 90°	115—117°	10—11	3,0 g
G 4	91 — 94°	117—121°	10—11	2,8 g kontinuierlich
G 5	96 —100°	122—126°	10—11	3,0 g kontinuierlich
G 6	101,5—105°	126—130°	10—11	1,3 g Hauptanteil 103–104°

Die Fraktionen G waren alle klar und farblos.

Ferner vereinigten wir die Fraktionen der Ester A und B, welche zwischen 110—125° bei 11—13 mm übergegangen waren. Dazu gaben wir noch Fraktion G 6 und den Destillationsrückstand der Ester G, welcher 6 g betrug. Die Summe dieses Estergemisches belief sich auf 23 g. Es wurde sorgfältig im Vakuum fraktioniert:

Fraktion	Temp. innen	Temp. außen	Druck mm	Bemerkungen
H 1	90 — 95°	121—125°	11	1,8 g kontinuierlich
H 2	96 —100°	126—130°	11	3,4 g Hauptanteil 98—99°
H 3	101,5—105°	130—133°	11	2,8 g Hauptanteil 103–104°
H 4	106 —110°	134—138°	11	2,7 g Hauptanteil 108–109°
H 5	110,5—115°	139—142°	11	2,3 g kontinuierlich
H 6	116 —119°	143—151°	11	2,0 g kontinuierlich
H 7	124 —128°	154—156°	11	0,7 g H. Teil 124°

Die Fraktionen H waren alle klar und farblos.

Zum Schlusse vereinigten wir noch die Ester A und B, welche zwischen 125—150° übergegangen waren. Dazu gaben wir noch die Fraktion H 7 und den Destillationsrückstand der Ester H, welcher 8 g betrug. Die Summe dieser Estergemische machte 15 g aus. Die erneute Vakuumdestillation ergab folgende Fraktionen:

Fraktion	Temp. innen	Temp. außen	Druck mm	Bemerkungen
J 1	103—115°	151—157°	11	0,7 g klar farblos
J 2	116—126°	158—165°	11	1,2 g klar, farblos, kont.
J 3	128—129°	166—170°	11	1,3 g hellgelb ölig
J 4	131—139°	171—185°	11	2,0 g gelb ölig kont.
J 5	142—145°	187—198°	11	2,0 g gelb ölig H. T. 143°
J 6	148—157°	192—210°	11	0,7 g gelb ölig kont.
J 7	160—180°	217—240°	11	1,7 g gelb ölig kont.

Der Destillationsrückstand betrug 5 g.

Fraktion E 3 und E 5 wurden beide getrennt nochmals fraktioniert:

Fraktion E 3, 77—78°, 10—11 mm, 2,7 g:

Bezeichnung	Temp. innen	Temp. außen	Druck mm	Bemerkungen
E 3a	74— 78°	90—102°	11	kontinuierlich
E 3b	78— 85°	103—115°	11	kontinuierlich

Fraktion E 5, 80—83°, 10—11 mm, 7,2 g:

E 5a	78— 81°	94—110°	11	3 g kontinuierlich
E 5b	82— 85°	111—120°	11	3 g kontinuierlich
E 5c	86— 95°	121—135°	11	0,5 g kontinuierlich

Diese Unterfraktionen stellten keine reinen Ester dar, sondern bildeten Mischfraktionen. Die Trennungsverhältnisse waren also

auch bei mengenmäßig viel größern Fraktionen nicht günstiger als bei den kleinen Fraktionen.

Elementaranalysen der Ester

Fraktion E 3 a:

5,058 mg Substanz gaben 8,680 mg CO_2 und 2,980 mg H_2O
Gefunden C = 46,80 % H = 6,59 %
Berechnet für $C_4H_6O_3$ C = 47,04 % H = 5,93 %

Fraktion E 5 b:

5,214 mg Substanz gaben 9,440 mg CO_2 und 3,220 mg H_2O
Gefunden C = 49,38 % H = 6,91 %
Berechnet für $C_6H_{10}O_4$ C = 49,29 % H = 6,90 %

Fraktion G 3:

5,008 mg Substanz gaben 9,280 mg CO_2 und 3,280 mg H_2O
Gefunden C = 50,54 % H = 7,33 %
Berechnet für $C_8H_{14}O_5$ C = 50,50 % H = 7,42 %

Fraktion H 3:

4,679 mg Substanz gaben 9,120 mg CO_2 und 3,200 mg H_2O
Gefunden C = 53,16 % H = 7,65 %
Berechnet für $C_9H_{16}O_5$ C = 52,91 % H = 7,90 %

Fraktion H 4:

4,887 mg Substanz gaben 9,565 mg CO_2 und 3,370 mg H_2O
Gefunden C = 53,38 % H = 7,65 %
Berechnet für $C_{11}H_{18}O_6$ C = 53,62 % H = 7,37 %
Berechnet für $C_{11}H_{20}O_6$ C = 53,19 % H = 8,12 %

Fraktion J 3:

5,240 mg Substanz gaben 9,700 mg CO_2 und 3,420 mg H_2O
Gefunden C = 50,40 % H = 7,30 %
Berechnet für $C_8H_{14}O_5$ C = 50,50 % H = 7,42 %

Fraktion J 5:

4,805 mg Substanz gaben 8,880 mg CO_2 und 2,960 mg H_2O
Gefunden C = 50,40 % H = 6,89 %
Berechnet für $C_8H_{13}O_5$ C = 50,77 % H = 6,93 %

Darstellung der Säureamide

Die Ester wurden in der 5fachen Menge reinstem absolutem Alkohol gelöst und in Bombenrohre gebracht. Es ist nötig, den reinsten Äthylalkohol zu verwenden, da sonst als Nebenprodukte fluoresceinartige Substanzen gebildet werden. Die Bombenrohre wurden in Kältemischungen gestellt und während 3—4 Stunden trockener Ammoniak eingeleitet, wodurch vollständige Sättigung erreicht wurde. Schon während des Einleitens konnten bei den niedrigst siedenden Estern kristalline Ausscheidungen beobachtet werden. Die alkoholischen Lösungen färbten sich gelb bis rotbraun. Nach erreichter Sättigung wurden die Rohre schnell zugeschmolzen, in Tücher gewickelt und ins Wasserbad gehängt, wo sie einige Stunden in der Siedehitze erwärmt wurden. Nach beendeter Reaktion wurden die Rohre in einer Kältemischung gut ausgekühlt und geöffnet. Die Inhalte wurden auf Glasfiltertiegel gebracht und die Rohre mit wenig eisgekühltem absolutem Alkohol nachgewaschen.

Amide I:

Ca. 1 g Ester der Fraktion E 2, 74—76°, 10—11 mm, wurden in 5 ccm absolutem Alkohol gelöst. Abscheidung weißer Kriställchen neben gelbgrün fluorescierenden. Lösung hellgelb gefärbt.

Unlösliche Amide

Weiße Krist. vom Smp. 240–242°. Aus Wasser umkrist. Smp. 242–243°.

Amid Ia: Gelbgrünflourescier. Krist. Smp. 168–169° Nicht weiter untersucht.

Alkohollösliche Amide

Eingeengt und stehen gelassen

Weiße Abscheidung: Nädelchen. Aus abs. Alkohol umkrist. Smp. 170°. Amid IC.

Lösung — Mit Äther gefällt

Weißer N'schlag: Umkrist. aus abs. Alkohol, uneinheitl. Nicht weiter untersucht.

Lösung: Äther abdest. Geringe ölige Substanz.

Amide II:

4,8 g der Ester E 3b, 78—85°, 11 mm, und E 4, 78,5—80°, 10—11 mm, wurden in 25 ccm absolutem Alkohol gelöst. Nach beendeter Reaktion war die Lösung hellgelb gefärbt, weiße Kriställchen hatten sich abgeschieden. Bei längerm Stehen kristal-

lisierten noch glänzende, weiße Nadeln aus, zu radialstrahligen Bündeln vereinigt. Der Rohrinhalt wurde auf einen Glasfiltertiegel gebracht. Die 2 Kristallarten wurden durch Auslesen der Nadeln schon mechanisch möglichst getrennt.

Unlösliche Amide

Amid IIa: ca. 2 g. Glänzende Nadeln. Smp. roh 165–170°. In Wasser ziemlich leicht löslich. In soviel kaltes Wasser gebracht, daß sich nur die Nadeln, nicht die beigemengten Krist. lösen. Abfiltriert u. stark eingeengt. Beim Abkühlen krist. quadrat. Krist. bei längerem Stehen noch Nadeln. Smp. 170–171°, konst. bei mehrmal. Umkrist. Über P_2O_5 getrocknet. Analyse.

Amid IIb: Weiße Krist. In H_2O schwer lösl. Umkrist. aus Wasser. Smp. 242–243°. Misch-Smp. mit Amid Ia keine Depress.

Alkohollösliche Amide

Eingeengt und stehen gelassen

Weiße Ausscheidg.

Amid IIc: Umkrist. aus abs. Alkohol. Smp. 169–170°. Misch-Smp. mit Amid IIa keine Depression.

Lösung

Mit Äther versetzt

Niederschlag: Sehr gering. Uneinheitlich. Nicht untersucht.

Filtrat: Äther abdest. Gelbes Öl, zum Teil weiße Krist. Menge sehr gering. Nicht untersucht.

Amide III:

Ca. 2 g des Esters E 5b, 81—85°, 11 mm. Hellgelbe Lösung, weiße krist. Abscheidung.

Unlösliche Amide

Amid IIIa: Weiße Krist. Smp. roh 240–245°. Umkristall. aus Wasser. Smp. 244°. Misch-Smp. mit Amid IIb gibt keine Depression.

Alkohollösliche Amide

Eingeengt und stehen gelassen. Keine Abscheidung. Mit Aether versetzt.

Weißer Niederschlag

Amid IIIb: In Wasser leicht löslich, in Aceton unlöslich. Umkristall. aus wenig abs. Alkohol. Smp. 165°. Unter dem Mikroskop uneinheitlich. Nicht weiter untersucht.

Ätherlösung

Äther abdest. Rötliche syrupartige Substanz, die beim Stehen allmähl. zum größten Teil krist. wird.

Amid IIIc: Smp. roh 80°. In Wasser leicht löslich. Umkrist. aus Benzol. Farblose taflige Kriställchen. Smp. 117°, etwas unscharf. Analysiert.

Amide IV:

4,9 g der Ester G 3 und E 7, 87—90°, 10—11 mm.
Hellbraune Lösung, Abscheidung weißer Kriställchen.

Unlösliche Amide

Amid IVa: Weiße Krist. Smp. 240°. Aus Wasser umkrist. Smp. 242–243°. Misch-Smp. mit Amid IIb gibt keine Depression.

Alkohollösliche Amide

Stark eingeengt

Abscheidung	Lösung
Bräunlich gefärbte Krist. Amid IVb: Aus abs. Alkohol unter Verwendung von Fasertonerde umkrist. Noch leicht rosa gefärbte flimmernde Blättchen. Smp. 173–174°. Über P_2O_5 getrocknet. Analysiert.	Mit Äther versetzt

Niederschlag	Lösung
Geringe Menge. Ident. mit Amid IVb.	Äther abdest. Geringe Menge einer gelbroten syrupösen Flüss. Krist. auch bei langem Stehen nicht. Nicht untersucht.

Amide V:

4,6 g der Ester G 4 und H 1, 90—95°, 11 mm.
Rotbraune Lösung, schmutzigweiße Abscheidung.

Alkoholunlösliches Amid

Amid Va: Umkrist. aus Wasser. Smp. 242°. Mischschmelzpunkt mit Amid IIb gibt keine Depression.

Alkohollösliche Amide

Stark eingeengt

Abscheidung	Lösung
Amid Vb: Graue Krist. Umkrist. aus abs. Alkohol. Smp. 165°. Aus Benzol umkristallis. Smp. 174°. Misch-Smp. mit Amid IVb gibt keine Depress.	Mit Äther versetzt

Niederschlag	Lösung
Bräunlich. Sehr gering. Nicht untersucht.	Äther abdest. Rote, ölige Subst. die nicht krist. wird. Gering. Nicht untersucht.

Amide VI:

3,2 g Ester G 5 und H 2, 96—100°, 11 mm.
Rotbraune Lösung, gelblichweiße krist. Abscheidung.

Alkoholunlösliche Amide

Amid VIa:
Smp. roh 240°. Umkrist. aus Wasser. Smp. 242–243°. Misch-Smp. mit Amid IIb gibt keine Depression.

Mutterlauge des Amides VIa: eingedampft gibt 2 g Rückstand. Aus abs. Alkohol umkrist. Weiße flimmernde Blättchen. Smp. 165°. Aus Benzol umkrist. Smp. 174–175°.

Amid VIb.
Misch-Smp. mit Amid IVb gibt keine Depression.

Alkohollösliche Amide

Stark eingeengt: kein Niederschlag. Beim Stehen Farbumschlag von rotbraun in dunkel blaugrün.

Mit Äther versetzt

Niederschlag	Lösung
Gering, blau gefärbt. In abs. Alkohol mit Fasertonerde gekocht gibt eine rötl. gefärbte Lösung, aus der nach dem Einengen eine uneinheitliche weiße Substanz kristallisiert. Sie wurde wegen der geringen Menge nicht weiter untersucht.	Stark eingeengt und stehen gelassen. Es krist. nadelförmige Kristalle, die auf Ton gestrichen werden. Smp. roh 70–73°. Aus Xylol umkrist. Smp. 88°. Amid VId. Vereinigt mit Amid VIIc.

Amide VII:

2 g des Esters H 3, 101,5—105°, 11 mm.
Lösung orangerot, sehr geringe gelbliche Abscheidung.

Alkoholunlösliches Amid

Amid VIIa:
Gelbliche Kristalle. Aus Wasser umkrist. Farbumschlag nach violett. Verwendung v. Fasertonerde. Smp. 220°. Vereinigt mit Amid VIIIa.

Alkohollösliche Amide

Im Vakuum auf ca. ein Drittel eingeengt. Keine Ausscheidung. Farbumschlag nach dunkelblau.

Mit Äther versetzt

Niederschlag	Lösung
Dunkelblaue Krist. In abs. Alkohol gelöst und mit Fasertonerde gekocht. Aus der eingeengten Lösung kristallisieren hellviolette Krist. Durch mehrmaliges Umkrist. werden sie farblos. Smp. 165°. Amid VIIb. Analysiert.	Stark eingeengt. Beim Stehen im Eisschrank Kristalle. Smp. roh 86°. Aus Xylol umkrist. Smp. 90°. Amid VIIc. Vereinigt mit Amid VId. Nochmals umkristallis. Smp. bleibt 90°. Im Vakuum über Paraffinschnitzeln getrocknet. Analysiert.

Amide VIII:

2 g des Esters H 4, 106—110°, 11 mm.
Lösung braun, sehr geringe gelbliche Abscheidung.

Alkoholunlösliches Amid

Gelbliche Kristalle. Beim Umkrist. aus Wasser Farbumschlag nach violett. Durch Behandeln mit Fasertonerde schließlich farblose Krist. Smp. 220°.

Amid VIIIa.
Vereinigt mit Amid VIIa.

Alkohollösliche Amide

Im Vakuum eingeengt. Farbumschlag nach blauschwarz.

Ausscheidung	Lösung
Gering, blauschwarz. In Wasser gelöst und mit Fasertonerde behandelt. Schmutzigweiße Kriställchen. Aus abs. Alkohol umkrist. Smp. 160–170°. Uneinheitlich. Nicht weiter untersucht.	Beim Stehen kristallis. nadelförmige Kristalle aus. Auf Ton gestrichen. Smp. roh ca. 80°. Leicht löslich in Wasser, Alkohol, Aceton. Umkrist. aus Xylol. Weiße flimmernde Nädelchen, die zu Blättchen zusammen filzen. Smp. 89°. Amid VIIIc. Misch-Smp. mit Amid VIIc 89–90°.

Amide IX:

3,2 g der Ester J 2 und H 6, 116—126°, 11 mm.
Lösung dunkelbraunrot, geringe gelbliche Abscheidung.

Alkoholunlösliches Amid

Gelbliche Kristalle. Aus Wasser umkrist. Farbumschlag nach violett. Farblos durch Kochen mit Fasertonerde. Smp. 220°.

Amid IXa.
Identisch mit Amid VIIIa. Ueber P_2O_5 getrocknet. Analysiert.

Alkohollösliche Amide

Eingeengt: Keine Ausscheidung. Farbumschlag nach blauschwarz.

Mit Äther versetzt

Niederschlag	Lösung
Blaugefärbt. In Alkohol gelöst und mit Fasertonerde gekocht. Ölige Substanz mit Kriställchen. Aus Aceton-H_2O umkrist. Gibt äußerst geringe Menge grauer Kriställchen. Nicht weiter untersucht.	Beim Stehen im Eisschrank Kriställchen. Auf Ton gestrichen. Smp. roh 72–73°. Leicht löslich in Wasser, Alkohol, Äther, Essigester, Aceton, Chloroform, Benzol. Umkrist. aus Xylol. Smp. 78°. konst. Amid IXc. Glänzende Nädelchen, die zu Blättchen verfilzen. Misch-Smp. mit Amid VIIc keine Depression. Analysiert.

Bemerkungen über die Amide der höhersiedenden Ester

Die Amidlösungen der höhersiedenden Ester J waren dunkelrotbraun gefärbt und wiesen nur äußerst geringe Abscheidungen schwerlöslicher Amide auf, die nicht untersucht werden konnten. Nach dem Absaugen durch Glasfiltertiegel wurden die Lösungen eingeengt und stehen gelassen. Dabei fand ein Farbumschlag über grün, blau nach violett bis schwarz statt. Zum Teil schieden sich geringe Mengen dunkelgefärbter Substanzen aus. Diese wurden in Alkohol oder Wasser gelöst und zur Entfärbung mit Fasertonerde gekocht, wozu wiederholtes Kochen notwendig war. Nach dem Abdestillieren des Alkohols oder Wassers blieben sehr geringe Mengen öliger bis fester Substanzen übrig. Sie waren in Wasser leicht löslich, in Aceton unlöslich. Versuche, sie aus einem Aceton-Wasser-Gemisch umzukristallisieren, ergaben so kleine Mengen grauer Substanzen, daß sie nicht weiter untersucht werden konnten. Gleich verhielt es sich mit den Substanzen, die sich noch in den alkoholischen Mutterlaugen befanden. Der Hauptanteil bestand aus Farbstoffen. An sich farblose Körper waren in allzu geringen Mengen vorhanden, als daß sie isoliert und gereinigt werden konnten.

Elementaranalysen der Amide

Amid II a 170—171 °

4,866 mg Substanz gaben 6,290 mg CO_2 und 2,630 mg H_2O
2,845 mg Substanz gaben 0,682 ccm N_2 bei 24 °, 753 mm

Gefunden	C = 35,26 %	H = 6,04 %	N = 27,3 %
Berechnet für $C_3H_6O_2N_2$	C = 35,27 %	H = 5,92 %	N = 27,46 %

Amid III c 117 °

4,854 mg Substanz gaben 8,640 mg CO_2 und 2,250 mg H_2O
2,750 mg Substanz gaben 4,800 mg CO_2 und 1,320 mg H_2O

Gefunden	C = 48,54 %	H = 5,18 %
	C = 48,39 %	H = 5,46 %
Berechnet für $C_4H_5O_2N$	C = 48,5 %	H = 5,0 %

Amid IV b 173—174°

5,192 mg Substanz gaben 8,725 mg CO_2 und 3,590 mg H_2O
3,066 mg Substanz gaben 0,561 ccm N_2 bei 24°, 767 mm

Gefunden	C = 45,81 %	H = 7,73 %	N = 21,22 %
Berechnet für $C_5H_{10}O_2N_2$	C = 46,12 %	H = 5,75 %	N = 21,53 %

Amid VII b 165°

5,135 mg Substanz gaben 8,715 mg CO_2 und 3,540 mg H_2O

Gefunden	C = 46,28 %	H = 7,74 %	
Berechnet für $C_6H_{10}O_2N_2$	C = 46,12 %	H = 7,75 %	

Amid VII c 90°

5,032 mg Substanz gaben 9,835 mg CO_2 und 3,740 mg H_2O
4,780 mg Substanz gaben 9,305 mg CO_2 und 3,510 mg H_2O
3,127 mg Substanz gaben 0,238 ccm N_2 bei 21°, 763 mm

Gefunden	C = 53,30 %	H = 8,31 %	
	C = 53,13 %	H = 8,22 %	N = 8,87 %
Berechnet für $C_7H_{13}O_3N$	C = 52,79 %	H = 8,23 %	N = 8,80 %

Amid IX c 78°

3,859 mg Substanz gaben 7,700 mg CO_2 und 2,920 mg H_2O
4,942 mg Substanz gaben 9,840 mg CO_2 und 3,810 mg H_2O
1,110 mg Substanz gaben 0,088 ccm N_2 bei 22°, 763 mm

Gefunden	C = 54,42 %	H = 8,47 %	
	C = 54,30 %	H = 8,62 %	N = 9,21 %
Berechnet für $C_7H_{13}O_3N$	C = 52,79 %	H = 8,23 %	N = 8,80 %

Amid IX a 220°

3,719 mg Substanz gaben 6,790 mg CO_2 und 2,770 mg H_2O
2,342 mg Substanz gaben 0,400 ccm N_2 bei 24°, 750 mm

Gefunden	C = 49,79 %	H = 8,33 %	N = 19,37 %
Berechnet für $C_6H_{12}O_2N_2$	C = 49,96 %	H = 8,39 %	N = 19,44 %

Identifizierung der analysierten Amide

Amid IIa $C_3H_6O_2N_2$ 170—171°

Aus Malonsäure stellten wir über den Ester das Diamid dar, welches bei 170° schmolz. Smp. nach Literatur 170°.

Der Mischschmelzpunkt mit Amid II a lag bei 170°. Amid IIa stellt also das Diamid der Malonsäure dar.

Amid III c $C_4H_5O_2N$ 117°

Es handelt sich um Succinimid, das beim Erhitzen aus dem Bernsteinsäurediamid derselben Fraktion entstand. Succinimid schmilzt allerdings nach Literatur bei 125°. Unser Imid ist also noch leicht verunreinigt.

Amid IV b $C_5H_{10}O_2N_2$ 173—174°

Glutarsäurediamid, aus dem Ester mit NH_3 dargestellt, vom Smp. 175° (Smp. nach Literatur 175°) gab mit Amid IV b einen Mischsmp. von 174—175°. Amid IV b ist also das Diamid der Glutarsäure.

Amid VII b $C_5H_{10}O_2N_2$ 165°

Auch dieses Amid ist Glutarsäurediamid, denn sein Mischsmp. mit Amid IV b und Glutarsäurediamid liegt bei 174°. Der Smp. von 165° wurde verursacht durch eine sehr geringe hartnäckige Verunreinigung, die sich beim Umkristallisieren aus Alkohol nicht entfernen ließ. Beim Umkristallisieren aus Benzol stieg der Smp. auf 174—175°.

Amid VII c $C_7H_{13}O_3N$ 90°

Bei dieser Substanz handelt es sich vermutlich um das Monoamid des Adipinsäuremethylesters, das in der Literatur noch nicht bekannt ist. Auch Amid IX c vom Smp. 78° ist vermutlich Adipinsäuremethylesteramid. Mit Amid VII c liegt der Mischsmp. bei 89—90°.

Amid IX a $C_6H_{12}O_2N_2$ 220°

Aus Adipinsäure wurde über den Methylester das Diamid hergestellt, welches bei 220° schmolz. Der Mischsmp. mit Amid IX a lag ebenfalls bei 220°. Amid IX a stellt also das Adipinsäurediamid dar.

Quantitative Bestimmung der Bernsteinsäure

3 g Lycopodiumsporonin wurde ozonisiert, die Ozonide wie üblich hydrolysiert und mit H_2O_2 oxydiert. Nach 6stündigem Er-

hitzen auf dem Wasserbad wurde der Kolbeninhalt ohne Abfiltrieren des unlöslichen Anteiles in einen Claisenkolben gebracht und wie üblich im Vakuum von Essigsäure und überschüssigem H_2O_2 abdestilliert. Der Kolbeninhalt wurde hierauf mit Wasser in einen Literstehkolben gespült und mit 15 ccm konz. H_2SO_4 versetzt. In der Siedehitze wurde von einer 5%igen Kaliumpermanganatlösung solange zugegeben, bis die violette Farbe 5 Minuten bestehen blieb. Im ganzen wurden 20 g $KMnO_4$ verbraucht. Nach beendeter Oxydation wurde in der Hitze solange SO_2 eingeleitet, bis sich der ausgeschiedene Braunstein gelöst hatte. Der Kolbeninhalt bildete jetzt eine schwach getrübte hellrosa gefärbte Lösung. Sie wurde in eine Porzellanschale gebracht und auf dem Wasserbad stark eingeengt. Dabei schieden sich Kristalle von K_2SO_4 und $MnSO_4$ ab. Die eingeengte Lösung wurde samt den ausgeschiedenen Kristallen quantitativ in den Perforator gebracht und mit Äther während 12 Stunden extrahiert. Dabei ging die als Abbauprodukt entstandene Bernsteinsäure in den Äther und schied sich nach dem Abdestillieren des Äthers in gelblich-weißen Kristallen ab. Die rohe Säure wurde durch Extraktion mit Chloroform gereinigt, wobei die Verunreinigungen von Chloroform aufgenommen wurden. Die gereinigte Säure war nun schön weiß. Der Smp. der gereinigten und getrockneten Kristalle wurde zu 183—184° bestimmt. Der Mischschmelzpunkt mit reiner Bernsteinsäure zeigte keine Depression.

1. Bestimmung: 3 g (2,970 g aschefrei) Sporonin gaben 0,485 g Bernsteinsäure.

2. Bestimmung: 3 g (2,970 g aschefrei) Sporonin gaben 0,434 g Bernsteinsäure.

Im Lycopodiumsporonin $C_{90}H_{112}O_{27}$ kann $C_4H_6O_4$ maximal 22,5mal enthalten sein. Aus 3 g Sporonin müßten in diesem Falle 4,708 g Bernsteinsäure entstehen. Da wir aus 3 g Sporonin 0,485 resp. 0,434 g erhielten, ergab sich durch Berechnung, daß aus einem Mol $C_{90}H_{112}O_{27}$ zwei Mole Bernsteinsäure gebildet worden waren.

Literaturverzeichnis

1. Handbuch der Pflanzenanalyse, Verlag Springer, 1932.
2. Untersuchungen von Sporopolleninen, Diss. Bern 1934.
3. Liebigs Ann. 461, 89, 1929.
4. Helv. Chim. Acta 14, 58.
5. Helv. Chim. Acta 14, 67 und 15, 457 und 670.
6. Zur Fossilierung der Sporopollenine, Diss. Bern 1934.
7. Die Erhaltung der Sporen und Pollenkörner in den Kohlen und ihre Veränderungen durch die Aufbereitung, Bot. Archiv 35, 1933. Die Korrosion des Pollens, Beihefte zum bot. Zentralblatt LIII, 1935.
8. Helv. Chim. Acta 15, 412 ff.
9. Helv. Chim. Acta 15, 670 ff.
10. Die thermische Schädigung des Pollens in der Kohle, Ber. der schweiz. bot. Gesellschaft, Bd. 42, Heft 1, 1933.